



# **Engenharia metabólica de *Chlamydomonas reinhardtii* e otimização ambiental da produção de hidrogénio**

**Teresa Maria da Silva Pinto**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
**Biologia Funcional**

Orientador: Doutora Maria da Glória Calado Inglês Esquível

## **Júri:**

Presidente: Doutor Ricardo Manuel Seixas Boavida Ferreira, Professor Catedrático do  
Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: Doutora Maria Manuela Coelho Cabral Ferreira Chaves, Professora Catedrática  
Aposentada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa  
Doutor João Daniel Correia Arrabaça, Professor Associado da Faculdade de  
Ciências da Universidade de Lisboa

Doutora Sara Barros Queiroz Amâncio, Professora Associada do Instituto Superior  
de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Doutora Maria da Glória Calado Inglês Esquível, Professora Auxiliar do Instituto  
Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Lisboa, 2011

## Agradecimentos

Agradeço à professora Maria da Glória Esquível porque sem ela não teria oportunidade de efetuar este trabalho. Agradeço todos os ensinamentos que me transmitiu, assim como toda a amizade e paciência que demonstrou durante todo este período de investigação.

Agradeço a todas as pessoas do Laboratório de Biotecnologia, em especial à Luísa e ao Carlos, pela paciência a fazer contas, ao Lucas, pela ajuda na análise estatística e por ouvir todas as minhas deambulações, à Patrícia, à Maria João e ao João.

Agradeço a todos os meus amigos, em especial à Rita, à Inês, à Isabel e à Mafalda por terem estado sempre presentes e ao Ingi, que mesmo sem saber me ajudou muito.

Agradeço a todos os membros da minha família por me acompanharem em mais esta caminhada.

Um agradecimento muito especial ao Sandro e à Rita por me apoiarem incondicionalmente e por partilharem o tempo deles com o meu trabalho.

Agradeço a bolsa de investigação científica cedida pela Fundação para a Ciência e Tecnologia no âmbito do projeto PTDC/EBB-EBI/102728/2008 que permitiu a realização deste trabalho.

Agradeço ao Dr Robert J. Spreitzer por fornecer os mutantes da rubisco.

## Resumo

O  $H_2$  é um combustível alternativo ao petróleo pois apresenta poder calorífico elevado e ausência de produtos de reação que contribuam para o efeito de estufa. O hidrogénio pode ser produzido por microalgas capazes de reduzir protões formando  $H_2$ , pela ação de hidrogenases. Contudo, o ciclo de Calvin é o maior competidor do poder redutor, usado pelas hidrogenases, sendo a rubisco uma das enzimas chave deste ciclo.

Aproveitando a existência de mutantes de rubisco em *Chlamydomonas*, pretendeu-se aumentar a produção de hidrogénio por meio de engenharia metabólica. Com este objetivo foram usados dois meios de cultura, sem e com enxofre, induzida hipóxia, e fez-se uma caracterização e comparação bioquímica dos mutantes.

A caracterização bioquímica consistiu na medição da atividade fotossintética, da clorofila, da proteína e do amido. Avaliou-se a eficiência fotoquímica máxima e a expressão da rubisco, hidrogenase, D1 e Lhcb1. A quantificação do  $H_2$  foi feita por cromatografia gasosa.

Das proteínas estudadas a mais estável foi a Lhcb1 e a que mais se degradou foi a D1 mostrando grande sensibilidade durante os ensaios.

Constatou-se que o meio sem enxofre foi mais adequado à produção de  $H_2$ . Contudo em meio completo nas condições estudadas também houve produção deste gás. Verificamos que um dos mutantes da rubisco (Y67A) produziu  $H_2$  em quantidades muito superiores aos outros mutantes e ao controlo, apresentando também maiores diferenças nos parâmetros estudados.

Palavras-chave: *Chlamydomonas reinhardtii*, produção de hidrogénio, rubisco, hidrogenase, deficiência de enxofre

## Abstract

The  $H_2$  is an alternative fuel, with a high calorific value and its combustion is absent of reaction products that bear greenhouse effects. Hydrogen can be produced by microalgae, which have the ability to reduce free protons into  $H_2$  via the action of hydrogenases. However, the Calvin cycle is the main competitor of reducing power used by the hydrogenases, and rubisco is a key enzyme of this cycle.

Taking advantage of the availability of *Chlamydomonas* rubisco mutants we intended to increase the hydrogen productivity by metabolic engineering. To achieve such aim two kinds of culture media, a sulfur-depleted and a repleted, in hypoxia conditions were used, and a biochemical characterization of the different mutants was performed.

In this study the photosynthetic activity, the maximum photochemical efficiency, the chlorophyll, protein and starch were measured. In addition, the expression of rubisco, hydrogenase, D1 and Lhcb1 were investigated. Quantification of  $H_2$  was performed by gas chromatography.

The protein Lhcb1 was more stable than the others proteins studied and D1 was deeply degraded, showing great sensitivity during the assays.

It was observed that the sulfur depleted medium was more suitable than the repleted medium for  $H_2$  production. However, in complete medium under the conditions studied the  $H_2$  production was also attained. The rubisco mutant, Y67A, produced hydrogen in much higher amounts than the others mutants and control, and display more differences in the parameters studied.

**Keywords:** *Chlamydomonas reinhardtii*, hydrogen production, rubisco, hydrogenase, sulfur deprivation

## Extended abstract

Currently, fossil fuels are the main energy source in the world, satisfying 41,6% of total consumption (IEA, 2010). However, it is a non-renewable source of energy and their combustion leads to various environmental pollutants compounds. Hydrogen ( $H_2$ ) is regarded as an alternative to oil due to its higher calorific value and its non-polluting combustion.

In nature occurs a reaction, catalyzed by hydrogenases, that use photosynthetically generated electrons (supplied by ferredoxin) for reduce proton and produce hydrogen. This hydrogen metabolism was first reported by Gaffron and Rubin, in 1942. So far, cyanobacteria and green microalgae, such as *Chlamydomonas reinhardtii*, are the organisms that have the ability to produce hydrogen and oxygen. However, hydrogenases catalyze this reaction under light and anaerobic conditions because these enzymes are oxygen-sensitive. Besides that, this hydrogen production is relatively weak and very transiently. In 2000, Melis and co-workers presented a two-stage method to separate oxygen evolution and hydrogen production, in order to prevent hydrogenases inactivation by oxygen. They selectively and partially inactivated the  $O_2$  evolving activity of photosystem II by incubating algal cultures in a sulfur depleted medium.

The photogenerated electrons to reduce free protons into  $H_2$  are donated by ferredoxin associated with the hydrogenases. However, the Calvin cycle is a competitor of this reducing power and rubisco is a key enzyme of this cycle.

Taking advantage of the remarkable metabolic complexity and flexibility for acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* and the availability of rubisco site-directed mutants (Y67A, Y68A and Y72A) from this microalga, we intended to increase the hydrogen productivity by metabolic engineering. To achieve this aim, two kinds of culture media, sulfur-depleted and repleted, hypoxia conditions were used, and a biochemical characterization of the different mutants was performed.

Measurements of light-induced oxygen evolution with a Clark-type  $O_2$  electrode demonstrated that the mutants Y67A and Y72A shared a very low  $O_2$  evolution capacity, thus producing a steady state involving  $O_2$  release by photosynthesis and the  $O_2$  uptake by respiration – a key factor for success in sustained  $H_2$  production.

A biochemical characterization of the different mutants was performed under sulfur repletion and deprivation at hypoxia conditions. For this characterization the photosynthetic activity, the maximum photochemical efficiency, the chlorophyll, protein and starch were measured. In addition, the expression of rubisco, hydrogenase, D1 and Lhcb1 were investigated.  $H_2$  quantification was performed also by gas chromatography.

The responses of the cells to S-deprived stress were apparently delayed for 24 h in Y67A and Y72A cells, as compared with the control and the Y68A mutant.

The protein Lhcb1 was more stable than the others proteins studied and D1 was deeply degraded, showing great sensitivity during the assays.

Rubisco showed a high degradation rates visible at 72h in S-deprived medium and the levels of this enzyme remained very low until the end of the assay. In S-repleted medium the enzyme maintained stable during the first 48 hours and a slight degradation started to be visible at 72 hours of the assay.

Hydrogenase had an expression pick at 24 hours in all strains in both conditions, except for the mutant Y67A that showed an expression pick at 48 hours of the assay.

Hydrogen was measured by gas chromatography. All mutants produced hydrogen in both kind of media, however the sulfur depleted medium was more suitable for this intend.

The rubisco mutant, Y67A, was the best producer and display more differences in the biochemical parameters studied.

The two other rubisco mutants produce also more hydrogen than the control strain.

In conclusion, Y67A mutant was the best producer among the other mutants studied because: (1) it has a low oxygen evolution rate during photosynthesis that avoids an inhibition of the hydrogenases; (2) it has a very low rubisco content which induce a down regulation of the Calvin cycle, main competitor of the reducing power utilized by the hydrogenases.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, hydrogen production, rubisco, hydrogenase, sulfur deprivation

# Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Extended abstract	iv
Abreviaturas	vi
1 Introdução	1
1.1 Objetivos	1
1.2 Estado da arte	1
2 Material e métodos	10
2.1 Material Vegetal	10
2.2 Teste de Winkler	10
2.3 Crescimento de culturas com vista à produção de hidrogénio	11
2.4 Contagem de células	12
2.5 Doseamento das clorofilas	12
2.6 Doseamento da proteína total solúvel	12
2.7 Doseamento de amido	13
2.8 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida	15
2.8.1 Preparação dos géis	15
2.8.2 Preparação das amostras para eletroforese:	16
2.8.3 Condições da corrida	16
2.9 Imunodeteção de proteínas numa membrana (Immunoblotting)	16
2.9.1 Detecção colorimétrica dos polipéptidos na membrana	17
2.9.2 Detecção quimioluminescente dos polipéptidos na membrana	18
2.10 Fluorescência	18
2.11 Medição da atividade fotossintética (eléctrodo de Oxigénio)	20
2.12 Medição do teor de hidrogénio	21
2.13 Análise estatística	22
3 Apresentação dos resultados	23
3.1 Medição do teor de oxigénio no meio de cultura dos mutantes de rubisco tendo em vista a produção de hidrogénio	23
3.2 Comparação fenotípica dos mutantes em meio de cultura completo e sem enxofre	24
3.2.1 Crescimento das culturas	25
3.2.2 Doseamento de clorofila	26
3.2.3 Determinação da eficiência fotoquímica máxima $F_v/F_m$	29
3.2.4 Doseamento de amido	31
3.2.5 Doseamento de proteínas	32
3.2.6 Expressão das proteínas relacionadas com a fotossíntese e com a produção de hidrogénio	33
3.2.6.1 Lhcb1	34
3.2.6.2 PsbA (D1)	35
3.2.6.3 Rubisco	36
3.2.6.4 Hidrogenase	38
3.3 Determinação do teor de hidrogénio produzido pelos mutantes de <i>Chlamydomonas</i> em meio sem enxofre e em meio com enxofre	38
4 Discussão dos resultados	40
5 Conclusão	44
6 Perspetivas futuras	45
7 Referências bibliográficas	47

## Índice de figuras

- Figura 1** – Esquema de uma *Chlamydomonas* tirado de uma microfotografia de microscopia eletrónica (Merchant *et al.*, 2007). 3
- Figura 2** – Cadeia transportadora de eletrões de uma cultura de *C. reinhardtii* em meio de crescimento completo (a) e em meio de crescimento sem enxofre onde ocorre inibição do PSII (b). ADP – adenosina difosfato; ATP – adenosina trifosfato; ATPase – ATP sintetase; Cyt<sub>b</sub><sub>6</sub>f – complexo citocromo b<sub>6</sub>f; Fdx – ferredoxina; FNR – ferredoxina NADPH redutase; HYD – hidrogenase; LHCI/LHCII – complexo antena I/II; NAD(P)H – nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato); NDH – NAD(P)H desidrogenase plastídica; PC – plastocianina; Pi – grupo fosfato; PQ – plastoquinona; PSI/PSII – fotossistema I e II; PTOX – oxidase plastidial (Hemschemeier *et al.*, 2009). 6
- Figura 3** – Reagente A, B e C para o doseamento da proteína total pelo método de Lowry modificado. 13
- Figura 4** – Modelo simplificado da dissipação energética pelo PSII. Processo fotoquímico (seta preta *Photochemistry*), um eletrão (e<sup>-</sup>) é transferido do centro de reação P680 para a quinona (Q<sub>A</sub>), primeiro aceitador de eletrões do PSII. Processo não fotoquímico (seta castanha *Heat*). Fluorescência (seta vermelha *Chlorophyll fluorescence*) (Baker, 2008). 19
- Figura 5** – Detalhe ilustrativo da câmara de medição de oxigénio do Oxytherm (elétrodo de oxigénio, Hansatech Instruments). 20
- Figura 6** - Esquema representativo da separação por GC de componentes de uma mistura AB. No momento da injeção da amostra (10 segundos) o que se pode ver no monitor do computador é a linha base do gás de arraste. Aos 20 segundos, os componentes A e B estão totalmente separados na coluna. Aos 30 segundos, pode ver-se no computadores que o componente A já foi eluído da coluna. Aos 50 segundos, toda a mistura saiu da coluna e os picos referentes às componentes A e B são visíveis no cromatograma final (User's Manual - M Series Micro Gas Chromatograph, Agilent, 2000). 22
- Figura 7** - Volume de tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 0,01M adicionado, durante a titulação efetuada no final do teste de Winkler, aos poços com as culturas dos mutantes Y67A, Y68A e Y72A e do controlo Wt-S1 (A). Fotografia com pormenor da placa durante a titulação do final do teste de Winkler (B). A reação do iodo com o amido confere a coloração azul ao conteúdo dos poços, após a titulação com Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> aparece a cor amarela. Quanto maior a quantidade de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> adicionada, maior a quantidade de oxigénio dissolvido. 23
- Figura 8** – Evolução da atividade fotossintética das culturas dos mutantes Y67A, Y68A e Y72A e do controlo Wt-S1. As medições foram feitas com um elétrodo de oxigénio do tipo Clark a 25°C e com uma iluminação de 480,7µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. Foram feitos ciclos de luz/escuras que se combinaram, consecutivamente, da seguinte forma: 5 minutos de luz, 2,5 minutos de escuras. 24
- Figura 9** – Curva de crescimento dos mutantes Y67A, Y68A e Y72A e do controlo Wt-S1 em meio de crescimento sem enxofre (A) e com enxofre (B), durante 120 horas. 25
- Figura 10** – Quantidade de clorofila total por célula dos mutantes Y67A, Y68A e Y72A e do controlo Wt-S1 durante 120 horas. A – meio de crescimento sem enxofre; B – meio de crescimento com enxofre. 27
- Figura 11** – Comparação da quantidade de clorofila, por célula, dos mutantes Y67A, Y68A e Y72A e do controlo Wt-S1 quando as culturas se desenvolvem em meio com (círculos pretos) e sem (quadrados brancos) enxofre. 28
- Figura 12** – Razão da clorofila a pela clorofila b dos mutantes Y67A, Y68A, Y72A e do controlo Wt-S1. A – meio de crescimento sem enxofre; B – meio de crescimento com enxofre. 29



- Figura 13** – Variação da eficiência fotoquímica máxima em células das estirpes mutantes Y67A, Y68A e Y72A e do controlo Wt-S1, durante 120 horas. A - meio de crescimento sem enxofre; B – meio de crescimento com enxofre. 30
- Figura 14** – Doseamento do amido por célula das culturas de Y67A, Y68A, Y72A e do controlo Wt-S1. A – meio sem enxofre; B – meio com enxofre. 31
- Figura 15** – Doseamento de proteínas por célula dos mutantes Y67A, Y68A, Y72A e do controlo Wt-S1. A – meio de crescimento sem enxofre; B – meio de crescimento com enxofre. 32
- Figura 16** – Comparação da quantidade de proteína, por célula, dos mutantes Y67A, Y68A e Y72A e do controlo Wt-S1 quando as culturas se desenvolvem em meio com (círculos pretos) e sem (quadrados brancos) enxofre. 33
- Figura 17** – Evolução da quantidade da proteína Lhcb1 durante a experiência de produção de hidrogénio dos mutantes Y67A, Y68A, Y72A e do controlo Wt-S1. Chapas fotográficas impressadas (30 segundos) por membranas de PVDF reveladas por quimioluminescência, com amostras recolhidas a diferentes tempos (0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas). Quantidade de amostra por poço, 15µL para todas as estirpes. 34
- Figura 18** – Evolução da quantidade da proteína PsbA durante a experiência de produção de hidrogénio dos mutantes Y67A, Y68A, Y72A e do controlo Wt-S1. Membranas de PVDF reveladas por colorimetria com amostras recolhidas a diferentes tempos (0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas). Quantidade de amostra por poço, 20µL para todas as estirpes; Marcador (M) - 5 µL. A banda do marcador que aparece na imagem é de 35kDa (meio sem enxofre) e de 35 e 27kDa (meio com enxofre). 35
- Figura 19** – Evolução da quantidade da proteína PsbA durante a experiência de produção de hidrogénio dos mutantes Y67A, Y68A, Y72A e do controlo Wt-S1. Chapas fotográficas impressadas (10 segundos) por membranas de PVDF reveladas por quimioluminescência, com amostras recolhidas a diferentes tempos (0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas). Quantidade de amostra por poço, 5µL para todas as estirpes. 36
- Figura 20** – Evolução da quantidade de rubisco durante a experiência de produção de hidrogénio dos mutantes Y67A, Y68A, Y72A e do controlo Wt-S1. Membranas de PVDF reveladas por colorimetria com amostras recolhidas a diferentes tempos (0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas). Quantidade de amostra por poço: Wt-S1 – 2,5µL; Y67A – 5 µL; Y68A – 2,5 µL; Y72A – 5 µL; Marcador (M) - 5 µL. A banda do marcador que aparece na imagem é de 52kDa. 37
- Figura 21** – Evolução da quantidade da proteína hidrogenase durante a experiência de produção de hidrogénio dos mutantes Y67A, Y68A, Y72A e do controlo Wt-S1. Chapas fotográficas impressadas (sem enxofre: Wt-S1 e Y68A – 2 minutos; Y67A e Y72A – 5 minutos / com enxofre: Wt-S1 e Y68A – 10 minutos; Y67A – 2 minutos e Y72A – 5 minutos) por membranas de PVDF reveladas por quimioluminescência, com amostras recolhidas a diferentes tempos (0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas). Quantidade de amostra por poço, 20µL para todas as estirpes; Marcador (M) - 5 µL. A banda do marcador que aparece na imagem é de 52kDa. 38
- Figura 22** – Teor de hidrogénio produzido pelas culturas de Y67A, Y68A, Y72A e Wt-S1 ao final de 72 horas. O crescimento das culturas foi feito em meio acetato com e sem enxofre e em condições de hipoxia. 39

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> – Poder calorífico de diversos combustíveis (adaptado de Santos e Santos, 2005).	2
<b>Tabela 2</b> – Mutantes de <i>C. reinhardtii</i> que apresentam uma produção de hidrogénio superior aos respetivos controlos (adaptado de Esquível <i>et al.</i> , 2011).	7
<b>Tabela 3</b> – Mutantes de <i>C. reinhardtii</i> em que a produção de hidrogénio foi inferior aos dos respetivos controlos (adaptado de Esquível <i>et al.</i> , 2011).	8
<b>Tabela 4</b> – Teor de hidrogénio (em ppm, em mL H <sub>2</sub> /L cultura e em mL H <sub>2</sub> /g clorofila) produzido pelas culturas de Y67A, Y68A, Y72A e Wt-S1, decorridas 72 horas de ensaio, em meio de cultura sem enxofre e completo, em condições de hipoxia.	39

## Abreviaturas

2-PGO – 2-fosfoglicolato

3-PGA – 3-fosfoglicerato

4CN – 4-cloro1-naphtol

Acetil-coA – Acetil-coenzima A

ADP – Adenosina difosfato

ANOVA – Análise de variância (*analysis of variance*)

ATP – Adenosina trifosfato

BSA – Albumina de soro de bovino (*bovine serum albumin*)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

$F_0$  – Fluorescência basal da clorofila a em folhas adaptadas ao escuro

$F_m$  – Fluorescência máxima da clorofila a em folhas adaptadas ao escuro

$F_v/F_m$  – Eficiência do PSII no escuro

GC – Cromatografia gasosa (*gas chromatography*)

HRP – Peroxidase de rábano (*horseradish peroxidase*)

Lhc – Complexo de captura de luz (*light harvesting complex*)

NADP – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NADP<sup>+</sup> – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida

PFR – Piruvato ferredoxina oxidoreductase

PSI – Fotossistema I (*photosystem I*)

PSII – Fotossistema II (*photosystem II*)

PSA – Persulfato de amônio

PVDF – Difluoreto polivenilideno (*polyvinylidene difluoride*)

$Q_A$  – Quinona A

Rubisco – Ribulose-bisfosfato carboxilase/oxigenase

RuBP – Ribulose-1,5-bisfosfato

SDS – Sulfato de sódio e laurilo (*sodium lauryl sulphate*)

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida – sulfato de sódio e lauril (*sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis*)

TBS – Tampão tris-salino

TCD – Detetor de condutividade térmica (*thermal conductivity dectector*)

TEMED – N,N,N',N'-tetrametilenodiamina

TTBS – Tampão tris-salino/Tween 20

Tween – Monolaurato de polioxilenosorbitano

# Introdução

## 1.1 Objetivos

Pretende-se com este trabalho através da engenharia biológica aumentar a produção de hidrogénio pela microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Para concretizar este objetivo fez-se a seguinte abordagem.

A produção de hidrogénio por esta microalga necessita que os eletrões provenientes da cadeia transportadora de eletrões sejam aceites, por via de uma ferredoxina, pelas hidrogenases (enzimas que catalisam a reação que produz hidrogénio). Contudo, o ciclo de Calvin é o maior competidor por este poder redutor sendo a ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase-oxigenase (rubisco) uma das enzimas chave deste ciclo.

Aproveitando a existência, no nosso laboratório, de três mutantes de rubisco em *Chlamydomonas* que apresentam uma menor atividade e um menor nível de expressão da enzima comparativamente ao controlo (Esquivel *et al.*, 2006), pretendeu-se inibir por esta via o ciclo de Calvin, e assim aumentar a disponibilidade de poder redutor às hidrogenases. Espera-se assim que estes mutantes possam produzir uma quantidade maior de hidrogénio. A produção sustentável de hidrogénio requer que as microalgas estejam numa situação de deficiência de enxofre (Melis *et al.*, 2000), macroelemento indispensável para a síntese proteica, o que necessita mudança de meio de cultura, tornando dispendioso o processo e de difícil aplicação a nível industrial. Outro objetivo deste trabalho foi conseguir obter uma produção de hidrogénio sem que seja necessário alterar o meio de cultura, para isso foi necessário monitorizar as alterações ao nível metabólico e de produção de hidrogénio das culturas de *C. reinhardtii* em meios com e sem enxofre.

Foi feita uma caracterização bioquímica dos três mutantes da enzima Rubisco e analisada a sua possível utilização para a produção sustentável de hidrogénio.

## 1.2 Estado da arte

Os combustíveis fósseis têm vindo a esgotar-se e são um dos grandes responsáveis pela emissão de gases com efeito de estufa, como o CO<sub>2</sub>, para a atmosfera terrestre e, consequentemente, pelas alterações climáticas (Show *et al.*, 2011).

Neste sentido, nas últimas décadas têm sido desenvolvidos esforços para encontrar fontes de energia renováveis e limpas, ou seja, com zero emissões de carbono.

Atualmente, o hidrogénio é considerado o combustível promissor alternativo aos combustíveis fósseis porque como produto da sua combustão apenas se liberta água, é altamente eficiente em células elétricas (Show *et al.*, 2011) e tem um poder calorífico

(quantidade de calor, por unidade de massa, gerada pela sua combustão) muito superior à de outros combustíveis (Tabela 1) (Santos e Santos, 2005).

**Tabela 1** – Poder calorífico de diversos combustíveis (adaptado de Santos e Santos, 2005).

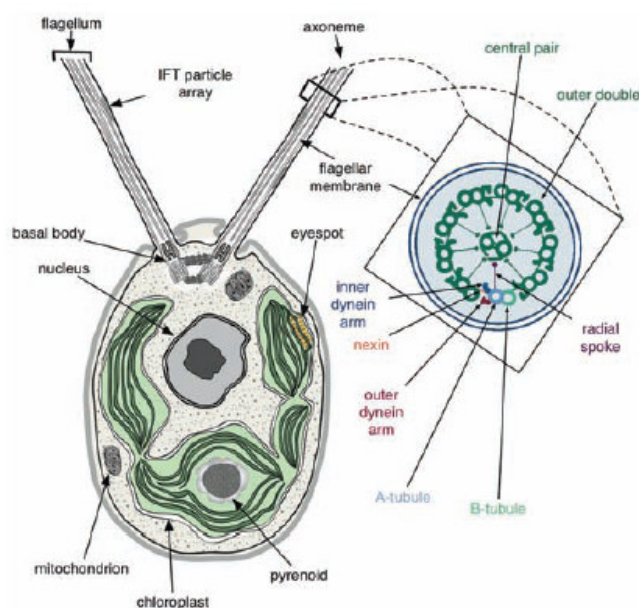
<b>Combustível</b>	<b>Poder calorífico (kJ/g)</b>
Hidrogénio	141,86
Metano	55,53
Propano	50,36
Gasolina	47,50
Gasóleo	44,80
Metanol	19,96

Existem várias formas de produção de hidrogénio e todas elas necessitam de alguma forma de energia, calor, luz ou eletricidade para se iniciar o processo. São de salientar as seguintes técnicas de produção: eletrólise da água, vapor reformando o gás natural ou outros hidrocarbonetos, gaseificação de biomassa e pirólises e fotobiológica (Santos e Santos, 2005). As mais utilizadas até agora são pouco amigas do ambiente dado que o hidrogénio é obtido através de processos termo-químicos com origem em combustíveis fósseis (Show *et al.*, 2011), ou seja, não são alternativas viáveis para os objetivos que se querem atingir.

No entanto, a produção de hidrogénio a partir de diferentes microrganismos tem sido reconhecida como uma solução eficaz porque é uma fonte inesgotável, tem um baixo custo de produção (Show *et al.*, 2011) e não compete por terrenos agrícolas como acontece com a produção de outros biocombustíveis (Kruse e Hankamer, 2010).

A produção de hidrogénio através de organismos fotossintéticos foi referida pela primeira vez em microalgas verdes por Gaffron e Rubin (1942). Mais tarde, em 1949, foi encontrada esta característica também em bactérias por Gest e Kamen. Presentemente, uma grande variedade de microrganismos fotossintéticos e não-fotossintéticos, tais como algas verdes unicelulares, cianobactérias, bactérias fotossintéticas anoxigénicas, bactérias anaeróbias obrigatórias e bactérias fixadoras de azoto são estudadas e modificadas com vista à produção de hidrogénio (Eroglu e Melis, 2011).

Neste trabalho analisou-se vários processos metabólicos que levam à produção de hidrogénio pela microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. A *C. reinhardtii* é uma alga verde, eucariota, unicelular de ~10µm, ubíqua e com uma distribuição geográfica muito abrangente (<http://www.chlamy.org>). Estas algas têm parede celular, um número variável de mitocôndrias, dois flagelos anteriores com funções de locomoção e de reprodução e um cloroplasto, onde está localizado todo o aparelho fotossintético (Merchant *et al.*, 2007) (Figura 1).



**Figura 1** – Esquema de uma *Chlamydomonas* tirado de uma microfotografia de microscopia eletrónica (Merchant *et al.*, 2007).

As células de *C. reinhardtii* são haploides e podem desenvolver-se num meio de cultura composto apenas por sais inorgânicos, uma vez que quando expostas à luz realizam a fotossíntese para produzir energia e compostos orgânicos. Por outro lado, quando estão às escuras, podem sobreviver se no meio de cultura existir acetato como fonte de carbono (<http://www.chlamy.org>). Esta microalga pode ser manipulada através de técnicas microbiológicas básicas, tem um ciclo de vida rápido, é um organismo não patogénico e pode ser conservado durante longos períodos de tempo em azoto líquido (<http://nutmeg.easternct.edu/~adams/ChlamyTeach/aboutchlamy.html>).

A *C. reinhardtii* é considerada um organismo modelo para a investigação devido às suas características de crescimento, já referidas anteriormente, e ao conhecimento de todo o seu genoma, tanto da mitocôndria (Vahrenholz *et al.*, 1993), como do cloroplasto (Maul *et al.*, 2002), como do núcleo (Merchant *et al.*, 2007). Para além disto, o DNA mitocondrial e nuclear são facilmente transformáveis, permitindo a sua modificação genética para obter novas linhas, para tal existem vários protocolos com métodos inovadores (Redding e Cole, 2008).

Este organismo fotossintético possui uma complexidade metabólica que lhe permite adaptar-se a condições de hipoxia e anóxia, quer ao nível da respiração aeróbia mas também ao nível de diversos mecanismos fermentativos, que possibilitam a acumulação de ácidos orgânicos (ácido acético e fórmico, por exemplo), etanol, dióxido de carbono e hidrogénio (Timmins *et al.*, 2009). Estas características são essenciais para uma otimização da produção de hidrogénio e fazem com que a *C. reinhardtii* seja considerada um dos melhores organismos fotossintéticos produtores de hidrogénio (Kruse e Hankamer, 2010).

Os projetos de investigação mais desenvolvidos recorrendo à utilização desta espécie estão relacionados com a locomoção, resposta a diversos estímulos ambientais, a fotossíntese e como interagem as células entre si (<http://www.chlamy.org>). Atualmente, vários estudos na área da bioremediação (Kola e Wilkinson, 2005) e da produção de biocombustíveis (Marín-Navarro *et al.*, 2010 – como revisão) têm vindo a ser desenvolvidos.

A produção de hidrogénio pela *C. reinhardtii* é catalisada pela enzima hidrogenase. Esta enzima participa na reação reversível que junta os prótons livres ( $H^+$ ) com os eletrões provenientes da ferredoxina reduzida para gerar hidrogénio molecular ( $H_2$ ) e foi pela primeira descrita em 1931 pelos investigadores Stephenson e Stickland.

A classificação das hidrogenases está relacionada com o ião metálico presente no seu centro ativo, sendo que existem três tipos de classes as [NiFe], as [FeFe]-hidrogenases e as que não têm nenhum ião metálico. As [NiFe]-hidrogenases estão presentes em bactérias e no reino *Archaea*, enquanto as [FeFe]-hidrogenases em bactérias e eucariótas, como a *C. reinhardtii* (Vignais *et al.*, 2001).

As [FeFe]-hidrogenases são codificadas pelos genes nucleares *HydA1* e *HydA2* (Happe e Kaminski, 2002), são relativamente pequenas tendo cerca de 48kDa de massa molecular (Happe e Naber, 1993) e estão localizadas no cloroplasto (Posewitz *et al.*, 2009). As hidrogenases de *C. reinhardtii* são sintetizadas nos ribossomas do citosol e depois transportadas para o estroma do cloroplasto onde pode ser observada a sua atividade (Maione e Gibbs, 1986). Segundo parece a segunda [FeFe]-hidrogenase, *HydA2* (Forestier *et al.*, 2003), não tem um papel muito importante na produção de hidrogénio (Godman *et al.*, 2010).

A *C. reinhardtii* possui três vias para a produção de hidrogénio: a biofotólise direta, a biofotólise indireta e uma última via, a fermentativa.

A primeira via tem início na oxidação da água, através da ação do fotossistema II (PSII – PhotoSystem II), que dá origem a prótons ( $H^+$ ), eletrões ( $e^-$ ) e oxigénio ( $O_2$ ). Esses eletrões são transferidos para o fotossistema I (PSI – PhotoSystem I) e vão servir para reduzir a ferredoxina, que é o dador de eletrões das hidrogenases (Posewitz *et al.*, 2009).

A segunda via envolve o catabolismo dos hidratos de carbono (como por exemplo, do amido) e necessita da atuação da NADP-plastoquinona oxidoreductase e do PSI para o transporte de eletrões. Esses eletrões serão depois os responsáveis pela redução da ferredoxina que, por sua vez, vai transferi-los à hidrogenase para que esta os combine com os  $H^+$  e forme  $H_2$  (Esquivel *et al.*, 2011 – como revisão).

A via fermentativa, que leva à formação de  $H_2$ , é iniciada pela enzima piruvato ferredoxina oxidoreductase (PFR1) que usa o piruvato como substrato e forma acetil-coenzima A (acetil-CoA) e dióxido de carbono ( $CO_2$ ). A PFR1, ao ficar no estado reduzido, reduz a ferredoxina.

E tal como nas duas vias anteriores, a ferredoxina reduzida vai doar os eletrões à hidrogenase para formar  $H_2$  (Posewitz *et al.*, 2009).

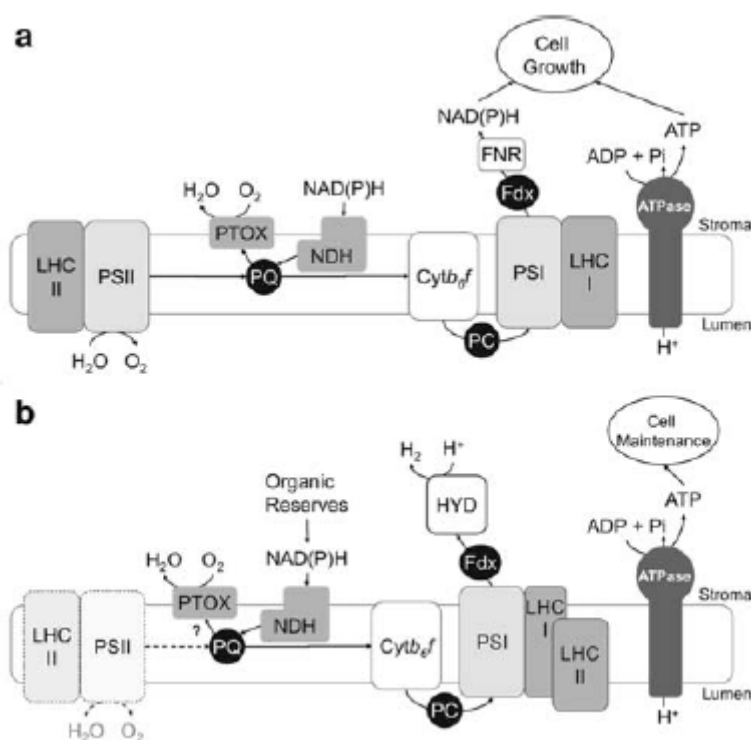
As [FeFe]-hidrogenases são sensíveis ao oxigénio, a sua atividade catalítica é inibida mesmo na presença de quantidades muito pequenas de oxigénio (níveis tão baixos como 1000ppm (v/v) (Lee e Greenbaum, 2003)) e a transcrição dos genes é também subexpressa (Mus *et al.*, 2007). Este facto implica que para ocorrer a produção de hidrogénio as culturas de *C. reinhardtii* têm de se desenvolver em condições de anaerobiose. Assim sendo, a atividade da hidrogenase e o funcionamento pleno do PSII são dois acontecimentos que não poderão ocorrer simultaneamente nas células (Marín-Navarro *et al.*, 2010). Dado que o funcionamento pleno do PSII vai libertar oxigénio e desta forma inibir a ação da hidrogenase.

A energia luminosa é outra condição indispensável para a produção sustentável de hidrogénio pela *C. reinhardtii*. Em 2005, verificou-se que após induzir anaerobiose às escuras e depois colocar as culturas à luz, ocorre uma produção de hidrogénio elevada mas apenas durante poucos minutos (Mus *et al.*, 2005). Neste sistema a hidrogenase aceita os eletrões provenientes do PSII e a hidrogenase é inibida pelo surgimento de oxigénio no meio (Hemschemeier *et al.*, 2009).

Ou seja, a formação deste biocombustível só é possível à luz se o oxigénio, que vai sendo libertado pela fotossíntese, for constantemente consumido antes de inibir a atividade da hidrogenase (Ghirardi *et al.*, 1997).

Uma das hipóteses formuladas para ultrapassar esta dificuldade foi diminuir a taxa fotossintética até níveis idênticos aos da respiração celular, permitindo às células consumir todo o oxigénio por elas produzido e, assim, não impedir a expressão e função da hidrogenase (Hemschemeier *et al.*, 2009). O problema da presença de oxigénio foi originalmente contornado através da remoção do enxofre do meio de cultura, dado que a sua ausência causa uma diminuição da taxa fotossintética porque o *turnover* da proteína D1 do PSII não se efetua visto a falta de enxofre inibir a síntese proteica. Por outro lado, numa cultura de *C. reinhardtii* sem enxofre, a assimilação de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) pela rubisco diminui visto os níveis desta enzima reduzirem drasticamente (Melis *et al.*, 2000; Hemschemeier *et al.*, 2008). Assim o ciclo de Calvin deixa de consumir eletrões e a via da hidrogenase é ativada, tornando-se uma consumidora alternativa dos eletrões provenientes da cadeia transportadora de eletrões (Figura 2).





**Figura 2** – Cadeia transportadora de elétrons de uma cultura de *C. reinhardtii* em meio de crescimento completo (a) e em meio de crescimento sem enxofre onde ocorre inibição do PSII (b). ADP – adenosina difosfato; ATP – adenosina trifosfato; ATPase – ATP sintetase;  $Cytb_6f$  – complexo citocromo  $b_6f$ ; Fdx – ferredoxina; FNR – ferredoxina NADPH redutase; HYD – hidrogenase; LHC I/LHC II – complexo antena I/II; NAD(P)H – nicotinamida adenina dinucleotídeo (fosfato); NDH – NAD(P)H desidrogenase plastídica; PC – plastocianina;  $P_i$  – grupo fosfato; PQ – plastoquinona; PSI/PSII – fotossistema I e II; PTOX – oxidase plastídica (Hemschemeier *et al.*, 2009).

Como em condições sem enxofre, a atividade da fotossíntese torna-se mais baixa do que a da respiração (Melis *et al.*, 2000) conseguiu-se obter bons resultados na produção de biohidrogénio, quer na quantidade produzida quer na duração da produção. No entanto, esta técnica coloca alguns inconvenientes para a sua utilização em larga escala, como por exemplo é sempre necessário ter uma cultura em crescimento em meio completo (ou seja, com enxofre) e depois transferi-la para meio sem enxofre. Esta transferência é demorada e acarreta uma perda significativa de material biológico.

A transformação genética parece ser a via que mais contributo poderá dar para o aumento da produção do hidrogénio. Até à data os alvos da engenharia genética foram as hidrogenases para torna-las menos sensíveis ao oxigénio (Flynn *et al.*, 2002; Dubini *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2010); as sulfato permeases para inibirem a entrada de enxofre nas células, simulando a falta de enxofre no meio de cultura (Chen *et al.*, 2005); o PSII para reduzir a produção de oxigénio (Surzycki *et al.*, 2007; Makarova *et al.*, 2007; Beckmann *et al.*, 2009; Torzillo *et al.*, 2009); as reservas de amido para aumentar as fontes alternativas de elétrons às hidrogenases (Doebbe *et al.*, 2007 e 2010; Chochois *et al.*, 2010); a taxa de respiração para consumir o oxigénio (Rühle *et al.*, 2008) e a ribulose 1,5-bisfosfato

carboxilase/oxigenase (rubisco) para inibir o ciclo de Calvin que é um competidor dos elétrons para as hidrogenases (Hemschemeier *et al.*, 2008) (Tabela 2). Existem no entanto alguns mutantes criados que não apresentam um aumento da produção de hidrogénio mas serviram para elucidar as vias metabólicas implicadas nesta produção, uma listagem desses mutantes está apresentada na tabela 3.

**Tabela 2** – Mutantes de *C. reinhardtii* que apresentam uma produção de hidrogénio superior aos respetivos controlos (adaptado de Esquivel *et al.*, 2011).

Alvo	Mutante	Mutação	Fenótipo	Produção de H <sub>2</sub>	Referência
Hidrogenase	<i>hemH-lba</i>	O gene <i>hemH</i> de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e o gene <i>lba</i> de <i>Glycine max</i> foram transferidos para o genoma do cloroplasto de <i>C. reinhardtii</i>	↓ Crescimento das algas transformadas vs Wt = Teor de clorofila vs Wt Culturas de células transformadas consomem o O <sub>2</sub> mais rapidamente e aumentam a produção de H <sub>2</sub> , quando comparadas com os controlos em meio com e sem S.	↑ 4x produção de H <sub>2</sub> vs Wt	Wu <i>et al.</i> , 2010
	D102K <sub>H</sub> T99K <sub>H</sub>	[FeFe] hidrogenases	↓ Energia livre de ligação ↑ A associação entre hidrogenase e ferredoxina	Mutantes promissores para o aumento da produção de H <sub>2</sub>	Long <i>et al.</i> , 2009
Sulfato permeases	<i>antisulP</i>	Repressão da expressão do gene <i>SulP</i>	↓ Taxa de produção de oxigénio em condições de saturação luminosa ↓ Quantidade de rubisco no cloroplasto ↓ Nível do estado fundamental da D1 (proteína do PSII)	↑ Produção de H <sub>2</sub> nas estirpes com baixa absorção de S e com capacidade para oxidar H <sub>2</sub> O	Chen <i>et al.</i> , 2005
Rubisco	CC-2803	Supressão da subunidade grande da rubisco	Produz H <sub>2</sub> na presença de S Sensível à luz	↑ Produção de H <sub>2</sub>	Hemschemeier <i>et al.</i> , 2008
Transporte de elétrons	<i>Stm6</i>	Cadeia cíclica de transporte de elétrons bloqueada	↑ Reservas de amido ↓ [O <sub>2</sub> ] dissolvido	↑ cerca de 9x produção de H <sub>2</sub> comparativamente com a estirpe, sem parede celular, que lhe deu origem	Kruse <i>et al.</i> , 2005
PSII	L159I-N230Y	Mutante da proteína D1	↓ Teor de clorofila ↑ Rendimento quântico da fotossíntese ↑ Taxa de respiração ↑ Duração da produção de H <sub>2</sub>	↑ 10x produção de H <sub>2</sub> vs Wt ↑ 5x produção de H <sub>2</sub> vs CC124	Torzillo <i>et al.</i> , 2009
	<i>Stm6Glc4T7</i>	Redução do tamanho do complexo antena do PSII	↑ Eficiência da conversão dos fotões ↑ Taxa de crescimento sob condições de grande luminosidade ↑ Eficiência fotossintética ↑ Densidade das culturas quando crescem em bioreatores de larga escala	Mutantes promissores para o aumento da produção de H <sub>2</sub>	Beckmann <i>et al.</i> , 2009
Reservas de amido	<i>Stm6Glc4</i>	Mutante <i>Stm6</i> que expressa o transportador de hexoses (HUP1) de <i>Chlorella kessleri</i>	Capacidade de importar glucose do meio e usá-la para aumentar a produção de biohidrogénio ↑ Taxa de crescimento sob condições de grande luminosidade Diferenças metabólicas notáveis na produção de hidrogénio anaeróbia quando comparado com o Wt (WT <i>cc406</i> )	↑ cerca de 150% a produção de H <sub>2</sub> vs <i>Stm6</i>	Doebbe <i>et al.</i> , 2007 Doebbe <i>et al.</i> , 2010
	<i>std3 sda6</i>	Degradação aeróbia do amido alterada	↑ Quantidade de amido residual (quer através de uma maior acumulação ou de uma menor degradação do amido ou de ambas as formas)	↑ Produção de H <sub>2</sub> vs Wt	Chochois <i>et al.</i> , 2010
Respiração	<i>apr1</i>	Razão fotossíntese/respiração alterada	↑ Taxa de respiração ↓ Taxa fotossintética	↑ 2-3x produção de H <sub>2</sub> vs Wt	Rühle <i>et al.</i> , 2008

**Tabela 3** – Mutantes de *C. reinhardtii* em que a produção de hidrogénio foi inferior aos dos respetivos controlos (adaptado de Esquivel *et al.*, 2011).

Alvo	Mutante	Referência
Hidrogenase	M214K <sub>H</sub>	Long <i>et al.</i> , 2009
	E221K <sub>H</sub>	Long <i>et al.</i> , 2009
	<i>hydEF-1</i>	Dubini <i>et al.</i> , 2009
	76D4	Flynn <i>et al.</i> , 2002
	141F2	Flynn <i>et al.</i> , 2002
	104G5	Flynn <i>et al.</i> , 2002
	155G6	Flynn <i>et al.</i> , 2002
Catabolismo do amido	<i>std1</i>	Chochois <i>et al.</i> , 2010
	<i>sda3</i>	
PSII	D1-R323	Makarova <i>et al.</i> , 2007
	Cy6Nac2.49	Surzycki <i>et al.</i> , 2007
PSI/PSII	<i>tla1</i>	Polle <i>et al.</i> , 2002

Neste trabalho foram estudados mutantes da rubisco para aumentar a produção de hidrogénio. Esta enzima fotossintética é muito importante para a otimização biotecnológica da produção de hidrogénio porque controla o ciclo de Calvin, o principal consumidor de eletrões necessários às hidrogenases. Por outro lado, a eficiência desta enzima está relacionada com a acumulação de amido e com o consumo de oxigénio na fotorespiração (Marín-Navarro *et al.*, 2010).

A entrada de energia e carbono na biosfera é realizada pela fotossíntese. Durante este processo, a rubisco (EC 4.1.1.39) catalisa a reação de adição do CO<sub>2</sub> à ribulose 1,5-bisfosfato (RuBP) formando duas moléculas de 3-fosfoglicerato (3-PGA) (Kapralov *et al.*, 2011). O 3-PGA é o primeiro composto intermediário do ciclo de Calvin que formará hidratos de carbono necessários ao funcionamento das células.

No entanto, a rubisco durante a catálise não consegue distinguir o CO<sub>2</sub> do O<sub>2</sub> (proveniente da oxidação da água). Assim na oxigenação da RuBP forma-se uma molécula de 3-PGA e uma molécula de 2-fosfoglicolato (2-PGO) que é o primeiro intermediário das reações da fotorrespiração. Esta via metabólica não essencial, tem a capacidade de recuperar algum do carbono do 2-PGO mas, desta forma, é gasta energia e a taxa e eficiência da assimilação de carbono é muito inferior (Kapralov *et al.*, 2011).

A rubisco de *C. reinhardtii*, tal como das plantas, pertence ao tipo forma I, é uma holoenzima composta por oito subunidades grandes e oito pequenas, com cerca de 560kDa. As subunidades grandes estão codificadas no gene *rbcL* do genoma do cloroplasto e têm cerca de 55kDa cada. As subunidades pequenas estão codificadas no gene nuclear *rbcS* e a sua massa molecular é de cerca de 15kDa (Spreitzer e Salvucci, 2002).

As subunidades pequenas da rubisco apresentam uma maior variabilidade genética entre espécies do que as grandes. Em particular, no *loop* entre a estrutura secundária  $\beta$ A e  $\beta$ B, geralmente denominado de *loop* A/B, essa divergência é muito elevada. O *loop* A/B projeta-se para o interior do canal da holoenzima e promove a interação entre subunidades

vizinhas, quer grandes quer pequenas (Esquivel *et al.*, 2006). Este *loop* tem 10 resíduos de aminoácidos em cianobactérias, 22 resíduos de aminoácidos em plantas e 28 nas algas verdes, como a *C. reinhardtii* (Spreitzer, 2003). O que se tem vindo a verificar é que mutações nesta zona específica provocam a alteração da estabilidade, da eficiência catalítica e da especificidade para o CO<sub>2</sub> ou para o O<sub>2</sub> da rubisco (Spreitzer *et al.*, 2001).

Neste trabalho os mutantes da rubisco utilizados são substituições dos resíduos de tirosina, 67, 68 e 72, por alaninas. Estes três resíduos estão localizados no final do loop A/B e foi já demonstrado que esta substituição de aminoácidos aromáticos (tirosinas) por não-aromáticos (alaninas) altera a conformação tridimensional da enzima e, consequentemente, a estabilidade estrutural, a atividade enzimática e a degradação *in vivo* (Esquivel *et al.*, 2006). Tendo em conta as características particulares destes mutantes da rubisco será analisada a sua possível utilização para a produção sustentável de hidrogénio.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Material Vegetal

Neste estudo foram utilizados 3 mutantes da subunidade pequena da rubisco o Y67A, o Y68A e o Y72A em que os resíduos de tirosina foram substituídos por resíduos de alanina, da alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*. Foram obtidos por mutagénese dirigida no Laboratório do Dr. Robert Spreitzer, segundo o método utilizado em Spreitzer *et al.* (2001), usando uma estirpe que não tem parede celular, a *RbcSΔ*-T60-3 *mt*. Esta estirpe, criada por Khrebtukova e Spreitzer (1996), é heterotrófica e por isso necessita de acetato para crescer devido à supressão de um *locus* de 13kb que contem os genes *RbcS1* e *RbcS2*. Como controlo utilizou-se a estirpe Wt-S1 que resulta da inserção em *RbcSΔ*-T60-3 *mt* do gene da subunidade pequena *RbcS1*. A substituição do aminoácido tirosina (Y) por alanina (A) foi conseguida por alteração do codão TAC por GCC (Spreitzer *et al.*, 2001).

O meio de cultura utilizado na manutenção e crescimento das 4 estirpes de *C. reinhardtii* tinha a seguinte composição: Tris-HCl 20mM; CH<sub>3</sub>COONa.3H<sub>2</sub>O 10mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,8mM; NH<sub>4</sub>Cl 7,5mM; MgSO<sub>4</sub> 0,4mM; CaCl<sub>2</sub> 340μM; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 23μM; MnCl<sub>2</sub> 5μM; ZnSO<sub>4</sub> 382nM; NaMoO<sub>4</sub> 205nM; CuSO<sub>4</sub> 160nM; CoCl<sub>2</sub> 52nM e KI 3nM (Spreitzer e Mets, 1981; Harris, 2009). Para a obtenção de meio sólido foi adicionado 1,5% de agar.

Os meios foram autoclavados à temperatura de 120°C e à pressão de 0,2MPa, durante 20 minutos.

As repicagens e inóculos das culturas foram feitas em câmaras de fluxo laminar (Telstar, Terrassa, Espanha). Para a manutenção das culturas, todos os meses foram realizadas repicagens, de forma a constituir o “stock” das culturas.

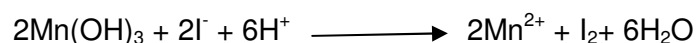
### 2.2 Teste de Winkler

O teste de Winkler é utilizado para determinar o nível de oxigénio dissolvido em amostras gasosas. Este teste pressupõe a realização de quatro etapas (Rühle *et al.*, 2008).

1ª etapa: fixação do oxigénio dissolvido:

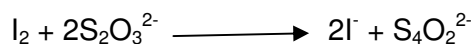


2ª etapa: dissolução do manganês



3ª etapa: coloração do iodo por adição de amido

4ª etapa: titulação



A quantidade de tiosulfato que se adiciona durante a titulação é estequiometricamente equivalente à quantidade de oxigénio dissolvida no meio.

Este teste foi usado para avaliar numa primeira fase do trabalho, a quantidade de oxigénio produzida por cada um dos mutantes da rubisco quando expostos à luz numa atmosfera de azoto.

No teste de Winkler é importante que as células estejam numa fase de crescimento exponencial. E é essencial que as duas primeiras etapas do método sejam feitas em condições de anaerobiose para prevenir a difusão de oxigénio atmosférico para as amostras e por isso o teste foi feito numa atmosfera de azoto.

Numa microplaca de 96 poços, foram colocados 800µL de cultura de células (previamente crescida até ao final da fase exponencial) e adicionados 200µL de meio de cultura fresco em cada poço. Essa placa foi colocada dentro de um saco estanque em ambiente saturado de azoto gasoso, com agitação constante e às escuras durante 30 minutos. Deste modo o oxigénio que possa ainda existir, é consumido na respiração. Decorrido esse tempo e mantendo as condições anteriores de ambiente saturado de azoto e agitação, a placa foi colocada sob iluminação durante 30 minutos.

Depois, foi adicionado 10µL de  $MnCl_2$  (0,34M), 10µL de KI/NaOH (0,24M/1,2M) e 50µL de  $H_3PO_4$  (50% v/v). A microplaca foi agitada para que todos os reagentes se misturassem. Seguidamente adicionou-se 10µL de amido (4% p/v), esta solução tem de ser feita no próprio dia da experiência, e voltou-se a agitar a placa. No final foi feita a titulação com tiosulfato de sódio (0,01M).

### ***2.3 Crescimento de culturas com vista à produção de hidrogénio***

As culturas, em meio líquido, cresceram em Erlenmeyer, com luz natural, à temperatura de 25°C num agitador orbital (Agitorb 200 IC, Aralab) a 120rpm, até ser atingida a fase estacionária (cerca de 5 dias). Ao 5º dia, acrescentou-se meio acetato (com enxofre) e ao 8º dia concentrou-se todas as células (500xg durante 5 minutos - Centrífuga Beckman Coulter™ Allegra™ 25R).

As células foram ressuspensas em meio acetato com e sem enxofre em balões volumétricos de 500mL. Em todos os balões as rolhas foram convenientemente seladas para que não existissem trocas gasosas com o exterior induzindo assim as condições de hipoxia. Os balões foram colocados no agitador orbital a 25°C com 120rpm com iluminação artificial ( $37\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$  – medidor de intensidade luminosa LI-250). Para os vários ensaios, em tempos fixos 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas foram retiradas 50mL de amostras da cultura de células, com a ajuda de uma pipeta volumétrica. Estas amostras foram centrifugadas a 2600xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células de Y67A e Y72A

foram ressuspensas em 250µL de meio de cultura com acetato; enquanto as de Y68A e Wt-S1 foram ressuspensas em 500µL de meio. Destas suspensões de células foram preparadas amostras para doseamento da proteína e para eletroforese. Para o doseamento do amido, foram retirados 15mL de amostra, de cada uma das culturas, que foram também centrifugadas a 2600xg durante 5 minutos sendo o precipitado congelado a -80°C.

## **2.4 Contagem de células**

Foram retiradas amostras de cultura (100µL) nos tempos desejados. Foi utilizado um hemacitômetro (Neubauer, W. Germany) e um microscópio ótico Leitz-Wetzlar Dialux, com uma ampliação de 100x para efetuar as contagens.

O hemacitômetro tem impressa uma quadrícula 5x5 de 0,0025mm<sup>2</sup> e uma profundidade de 0,100mm. A contagem das células pode exprimir-se da seguinte forma:

$$\text{Concentração de células} = n^{\circ} \text{ de células contadas} \times 10^4 \text{ mL}^{-1}.$$

## **2.5 Doseamento das clorofilas**

Das culturas de células em crescimento foi retirado 1mL e colocado em eppendorfs de 1,5mL. Em seguida, efetuou-se uma centrifugação de 2000xg (centrífuga mini spin Plus da Eppendorf) durante 5 minutos. Todo o sobrenadante foi descartado e o pellet, contendo as células, foi ressuspendido em 1mL de acetona a 80% saturada de carbonato de magnésio (MgCO<sub>3</sub>). Estes eppendorfs ficaram às escuras a 4°C durante 1h30m para a extração completa da clorofila.

Seguidamente foi feita uma centrifugação a 5000xg durante 10 minutos para concentrar no *pellet* os restos celulares. Depois desta centrifugação foi aproveitado o sobrenadante para medir a concentração da clorofila por leitura da absorvância no espectrofotômetro (Shimadzu UV mini 1240) a 645 e a 663nm.

As expressões obtidas por Mackinney (1941) para calcular as concentrações de clorofila a, b e total numa solução de acetona a 80% são:

$$[\text{clorofila a}] (\mu\text{g/mL}) = 12,7 \times \text{Abs}(663) - 2,69 \times \text{Abs}(645)$$

$$[\text{clorofila b}] (\mu\text{g/mL}) = 22,9 \times \text{Abs}(645) - 4,68 \times \text{Abs}(663)$$

$$[\text{clorofila total}] (\mu\text{g/mL}) = 20,2 \times \text{Abs}(645) + 8,02 \times \text{Abs}(663)$$

## **2.6 Doseamento da proteína total solúvel**

Os métodos de quantificação de proteínas baseiam-se na seguinte reação, um reagente químico é adicionado a uma amostra proteica, produzindo um resultado visual, como por exemplo uma mudança de cor. Esta mudança é medida com um espectrofotômetro e o valor

obtido é comparado com uma reta de calibração onde as concentrações proteicas são previamente conhecidas.

O método utilizado para a quantificação de proteínas foi o de Lowry modificado por Bensadoun e Weinstein (1976). Em meio alcalino as proteínas reagem com o cobre formando um complexo (reação de biureto) que reduz uma mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin & Ciocalteu) produzindo um composto com absorção máxima a 750nm.

Para a reta de calibração utilizaram-se quantidades de albumina de soro de bovino (BSA - Bovine Serum Albumin) que variaram entre 0 e 35µg num volume final de 250 µL.

Às amostras de proteína foi adicionada água até perfazer o volume de 250µL. Seguidamente foram adicionados 50µL de desoxicolato de sódio (1% p/v) e 1mL de ácido tricloroacético (10%). O desoxicolato de sódio é um detergente aniônico que teve como função degradar as membranas e o ácido tricloroacético serviu para precipitar as proteínas em solução. Esperou-se 10 minutos e centrifugou-se esta solução a 6700xg durante 5 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e, ao pellet, adicionou-se 1mL de reagente C (Figura 3). Depois de dissolver o pellet, no vórtex, esperou-se 10 minutos.

**Reagente A** – NaOH 1M, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% (p/v), tartarato de sódio 0,16% (p/v), SDS 1% (p/v)  
**Reagente B** – CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 4% (p/v)

**100 A : 1 B ⇒ Reagente C**

**Figura 3** – Reagente A, B e C para o doseamento da proteína total pelo método de Lowry modificado.

Adicionou-se 0,1mL de reagente de Folin & Ciocalteu (Sigma-Aldrich F9252) diluído 1:1, agitou-se e a solução, as amostras foram guardadas às escuras durante 30 minutos para se desenvolver a cor.

No final, numa microplaca de 96 poços colocou-se 200µL das várias amostras e depois foi medida a absorvência a 750nm (Biotek Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader). Os valores obtidos são comparados com a reta de calibração obtida.

Para todas as amostras foram realizados triplicados.

## **2.7 Doseamento de amido**

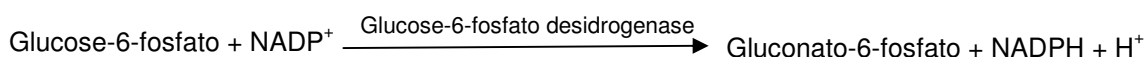
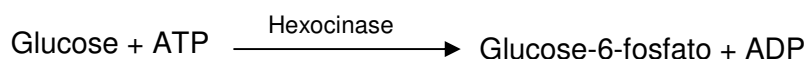
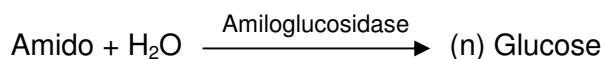
O amido é o hidrato de carbono de reserva mais importante na maioria dos organismos vegetais. O amido tem uma elevada massa molecular, é insolúvel em água e é normalmente constituído por dois componentes: a amilose e a amilopectina.

A amilose tem ligações glicosídicas do tipo α-1,4, este tipo de ligação confere à cadeia uma tendência para se enrolar em hélice.



A amilopectina é uma molécula ramificada, sendo que a ligação glicosídica que dá origem à ramificação é do tipo  $\alpha$ -1,6 (Ricardo e Teixeira, 1993).

Neste trabalho utilizou-se para a quantificação de amido um método indireto enzimático, em que há formação de NADPH que absorve a luz no comprimento de onda de 340nm, de acordo com o método descrito por Jones *et al.* (1977). Para que a medição do teor de amido seja possível por este método enzimático, é necessário hidrolisá-lo e posteriormente transformá-lo em glucose, através das seguintes reações:



As amostras preparadas anteriormente (ver capítulo 2.3 – Crescimento de culturas com vista à produção de hidrogénio) foram descongeladas e adicionou-se 1,5mL de tampão Tris-HCl 100mM pH 8,0 e efetuou-se uma homogeneização vigorosa com a ajuda de um vórtex. Centrifugou-se o homogenato a 6000xg durante 3 minutos e desprezou-se o sobrenadante. Em seguida removeu-se as clorofilas por extração em etanol 80% (v/v) durante 30 minutos, à temperatura de 80°C, seguida de centrifugação de 11300xg durante 3 minutos sendo desprezado o sobrenadante. Para remover os açúcares solúveis, foram feitas três lavagens do precipitado com 1,5mL de água seguida de centrifugação a 11300xg durante 3 minutos sendo desprezando o sobrenadante.

Uma etapa essencial de todo este processo foi a solubilização do amido, obtida através de uma autoclavagem de 3 horas a 120°C.

Ensaio enzimático:

Em eppendorfs, foram colocados 500µL de tampão acetato de sódio 0,1M pH 4.4, 10µL de amiloglucosidase (EC 3.2.1.3) (Boehringer, 10mg/mL, diluição de 1:10 (v/v)) e 20µL de  $\alpha$ -amilase (EC 3.2.1.1) (Boehringer, 10mg/mL, diluição de 1:50 (v/v)) e adicionou-se 100µL de amostra autoclavada. Esta solução esteve em incubação durante 4 horas a 37°C.

Fez-se uma centrifugação de 11300xg durante 3 minutos, de onde se aproveitou o sobrenadante contendo os açúcares solúveis. Em eppendorfs com 825µL de tampão imidazol 0,1M +  $\text{MgCl}_2$  1,5mM pH 6.9, 30µL ATP (19,8mM), 30µL  $\text{NADP}^+$  (25,4mM), 1µL hexocinase (EC 2.7.1.1), 1µL glucose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49) e 1µL glucose-6-fosfato isomerase (EC 5.3.1.9) adicionou-se 30µL de amostra. As soluções enzimáticas foram preparadas em tampão imidazol da seguinte forma: hexocinase (Boehringer, 1500U/mL) 2:1 (v/v); glucose-6-fosfato desidrogenase (Boehringer, 5mg/mL) 2:1 (v/v); glucose-6-fosfato isomerase (Boehringer, 10mg/mL) 2:1 (v/v). O teor de amido foi medido pela variação da absorvância a 340nm (pico de absorção do NADPH).

## 2.8 Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida

A eletroforese é uma técnica reprodutível e rápida para quantificar, comparar e caracterizar proteínas. Este método de separação baseia-se na migração de íões por ação de um gradiente elétrico.

Atualmente uma das técnicas de eletroforese mais usadas na separação de proteínas é o SDS-PAGE (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrilamide Gel Electrophoresis*) em que a separação se baseia na sua massa molecular (Bollag e Edelstein, 1991). O SDS, adicionado às amostras durante a sua preparação, e a fervura desnatura as proteínas e confere-lhes uma carga global negativa. Como todas as proteínas têm uma carga global negativa, vão migrar para o ânodo. Esta eletroforese denomina-se desnaturante dado que, durante a preparação das amostras, as proteínas são totalmente desnaturadas por ação do calor e do detergente SDS. A migração das proteínas faz-se através dos poros do gel de acrilamida, tendo mais facilidade de movimentação as proteínas de baixa massa molecular. Neste trabalho utilizou-se um sistema descontínuo, desenvolvido por Laemmli (1970), composto por dois géis, o concentrador e o separador, em que se adiciona SDS a todos os tampões. O gel de poliacrilamida, como suporte electroforético, resulta da polimerização de monómeros de acrilamida em longas cadeias, cujo entrecruzamento é feito por N,N'-metileno-bisacrilamida. A reação de polimerização processa-se na presença de um catalisador, o persulfato de amónio (PSA), e é iniciada pelo N,N,N',N'-tetrametilenodiamina (TEMED), que catalisa a formação de radicais a partir do PSA (Hames, 1990).

### 2.8.1 Preparação dos géis

A composição dos géis utilizados neste trabalho foi a seguinte:

- Gel concentrador:  $C_3H_5NO$  (Acrilamida) 0,82M;  $C_3H_5NO$  (Bisacrilamida) 69mM; Tris-HCl 0,124M;  $C_6H_{16}N_2$  (TEMED) 1mM;  $C_{12}H_{29}NO_4S$  (SDS) 0,1% e  $H_8N_2O_8S_2$  (PSA) 3mM.
- Gel separador:  $C_3H_5NO$  (Acrilamida) 1,37M;  $C_3H_5NO$  (Bisacrilamida) 17mM; Tris-HCl 0,375M;  $C_6H_{16}N_2$  (TEMED) 13mM;  $C_{12}H_{29}NO_4S$  (SDS) 0,1% e  $H_8N_2O_8S_2$  (PSA) 1,8mM.

Para a preparação do gel, propriamente dita, fez-se a montagem das cassetes do sistema da Bio-Rad (Mini-Protean 3), misturaram-se os componentes do gel de separação, deixando o PSA para o final. Imediatamente após a adição do PSA, introduziu-se a mistura nas cassetes e sobre o gel colocou-se uma camada de água, que tem como objetivo reduzir o contacto do gel com o oxigénio do ar, dado que a acrilamida em contacto com o oxigénio tem dificuldade em polimerizar. A polimerização do gel de separação demorou nunca menos de 45 minutos, ao fim dos quais se retirou, completamente, a camada de água. De seguida, a restante cassette foi preenchida com gel de concentração e colocado o pente, de modo a

formar os poços necessários para a aplicação das amostras. Esta polimerização durou cerca de 30 minutos. No final, retirou-se o pente e lavaram-se os poços com água desionizada.

### 2.8.2 Preparação das amostras para eletroforese:

A 100µL de amostra para eletroforese adicionou-se 33,5µL de tampão amostra, cuja composição e concentração final na solução de proteína foi a seguinte: tampão Tris-HCl 0,08M pH 6,8, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS (mercaptoetanol) 0,1M, SDS 2% (p/v), glicerol 15% (v/v) e *m*-cresol púrpura 0,006% (p/v).

Estas amostras foram agitadas num vórtex e aquecidas a 98°C durante 4 minutos para uma total desnaturação das proteínas. Todos os eppendorfs contendo as amostras para eletroforese foram congelados a -80°C para posterior utilização.

Imediatamente antes da eletroforese, as amostras de proteínas, preparadas anteriormente foram descongeladas e feita uma centrifugação rápida (cerca de 10s). O sobrenadante, contendo as proteínas, foi aplicado nos poços do gel com a ajuda de uma seringa Hamilton.

### 2.8.3 Condições da corrida

A corrida dos géis foi realizada em aparelhos de eletroforese vertical, a corrente constante (50mA) e tensão de 200V. Estando os géis submersos em tampão catódico (25mM Trizma base, 192mM glicina, 0,1% (p/v) de SDS a pH 8,3), para que a corrente nunca fosse interrompida.

## 2.9 *Imunodeteção de proteínas numa membrana (Immunoblotting)*

Towbin *et al.* (1979) descreveram pela primeira vez a transferência de polipéptidos, separados electroforeticamente, dum gel para uma membrana. Esta técnica é extremamente importante uma vez que permite identificar uma única proteína proveniente duma mistura complexa anteriormente separada pelas suas massas moleculares. Desta forma é possível combinar as propriedades analíticas da eletroforese com a especificidade dos anticorpos.

Neste trabalho as membranas utilizadas foram de difluoreto polivinilideno – PVDF (do inglês *PolyVinylidene DiFluoride*) – dado que apresentam grande capacidade de retenção de proteínas.

Após a eletroforese, foi preparada uma “sandwich” com os componentes ordenados da seguinte forma: esponja de fibra, duas folhas de papel Whatmann 3MM, membrana, gel, duas folhas de papel Whatmann 3MM e esponja de fibra. Esta “sandwich” foi preparada mergulhada em tampão de transferência (25mM Trizma base, 192mM glicina, 20% (v/v) metanol a pH 8,3), tendo-se o cuidado de remover todas as bolhas de ar que se formem

porque poderiam originar locais onde não houvesse contacto entre os vários componentes e assim a transferência não se realizasse com êxito.

Outro facto que se teve em atenção foi a disposição do gel e da membrana, dado que as proteínas migram do cátodo para o ânodo, o gel terá de ficar do lado do cátodo e a membrana do lado do ânodo.

Depois de todo o sistema (Mini Trans-Blot Cell da Bio-Rad) montado, a transferência realizou-se na câmara fria (4°C), durante toda a noite, com uma corrente constante de 20V.

Terminada a fase de transferência procedeu-se à imunodeteção da proteína de interesse, todas as etapas seguintes foram realizadas à temperatura ambiente, em tinas de plástico sujeitas a agitação orbital (cerca de 35rpm).

A “sandwich” foi desmontada e a membrana lavada com tampão TTBS (100mM Trizma base, 0,9% (p/v) NaCl, 0,1% (v/v) Tween 20 a pH 7,5), durante 1 hora. Após esta lavagem, a membrana foi incubada com o primeiro anticorpo específico durante 1,5 hora. Neste trabalho, foram utilizados 4 anticorpos: o anti-Rubisco nativa, obtido em coelhos, por Esquivel *et al.* (1998) (diluição de 1:1000 em TTBS); o anti-HydA (diluição de 1:5000 em TTBS aconselhada pelo fabricante Agrisera); o anti-Lhcb1 (diluição de 1:2000 em TTBS aconselhada pelo fabricante Agrisera) e o anti-PsbA (diluição de 1:10000 em TTBS aconselhada pelo fabricante Agrisera). De seguida, foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos com TTBS e uma com TBS (100mM Trizma base, 0,9% (p/v) NaCl a pH 7,5), com a mesma duração.

Estas lavagens tiveram como função remover o excesso do primeiro anticorpo. A incubação com o segundo anticorpo (Blotting Grade Affinity Purified, Goat antirabbit IgC(H+L), HRP (do inglês *HorseRadish Peroxidase*) Conjugate da Bio-Rad) (diluição de 1:2000 em TTBS) durou 1 hora.

Após a incubação com o anticorpo secundário, foram usadas 2 vias para a deteção das proteínas na membrana: a colorimétrica e quimioluminescente. Conforme a via escolhida assim foram feitas as lavagens das membranas. No caso da via colorimétrica, foram feitas 3 lavagens com TTBS e uma com TBS, cada uma delas de 10 minutos. No caso da quimioluminescente, foram feitas 6 lavagens com TTBS, cada uma delas de 10 minutos.

### **2.9.1 Deteção colorimétrica dos polipéptidos na membrana**

O segundo anticorpo estava previamente conjugado com uma peroxidase que atuou, durante a revelação, como agente marcador. Este marcador, depois de se adicionar o substrato da reação ( $H_2O_2$ ) e de reagir com o 4-cloro1-naphtol (4CN), permitiu a visualização das bandas em cor púrpura (Bollag e Edelstein, 1991).

Para a revelação das bandas, foi necessário preparar duas soluções. A primeira solução, composta por 25mL de TBS (a 37°C) e 15μL de  $H_2O_2$  e a segunda por 15mg de 4CN e 5mL

de metanol (a 4°C). Da junção destas duas soluções obteve-se a solução reveladora, onde foi mergulhada a membrana.

Assim que as bandas foram visíveis, retirou-se a solução reveladora e lavou-se a membrana com água para interromper a revelação, de forma a não obter um *background* elevado.

### **2.9.2 Detecção quimioluminescente dos polipéptidos na membrana**

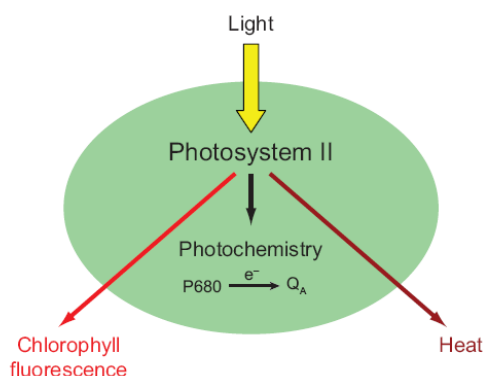
A quimioluminescência é uma técnica que consiste na produção de luz a partir de uma reação química. A enzima HRP (do inglês *HorseRadish Peroxidase*), que está conjugada ao segundo anticorpo, em presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalisa a oxidação do luminol. Quando oxidado o luminol produz luz para voltar ao seu estado natural. Vários fenóis são adicionados ao luminol para que a intensidade e longevidade do sinal emitido seja maior (Guy, 1996).

Este tipo de detecção tornou-se muito comum devido às vantagens que apresenta, por exemplo: tem uma elevada sensibilidade (concentrações de proteína superiores a 1pg são visíveis); uma resolução elevada; não é radioativa e é possível, com a mesma membrana, obter várias imagens com tempos de exposição diferentes.

Após as lavagens as membranas foram incubadas, com uma solução 1:1 de luminol/potenciador e tampão peróxido, durante 4 minutos. Depois retirou-se o excesso de líquido e envolveram-se as membranas numa película de plástico. A chapa fotográfica (Kodak BioMax Light Film) foi colocada em contacto com as membranas dentro das cassetes radiológicas em tempos de exposição diferentes. No final, a chapa fotográfica foi revelada por imersão nas seguintes soluções, pela ordem apresentada: solução reveladora (GBX developer da Sigma-Aldrich P7042), solução fixadora (GBX Fixer da Sigma-Aldrich P7167) seguida de lavagem em água.

### **2.10 Fluorescência**

As clorofilas dos organismos fotossintéticos possuem três formas de dissipar a energia luminosa, através de processos fotoquímicos, não fotoquímicos (calor) e da fluorescência (Figura 4). A fluorescência é responsável por apenas 3 a 4% da energia total dissipada (Azcón-Bieto *et al.*, 2000), no entanto, a sua medição permite monitorizar a eficiência fotossintética em plantas de forma não-invasiva (Baker e Rosenqvist, 2004).



**Figura 4** – Modelo simplificado da dissipação energética pelo PSII. Processo fotoquímico (seta preta *Photochemistry*), um elétron ( $e^-$ ) é transferido do centro de reação P680 para a quinona ( $Q_A$ ), primeiro aceitador de elétrons do PSII. Processo não fotoquímico (seta castanha *Heat*). Fluorescência (seta vermelha *Chlorophyll fluorescence*) (Baker, 2008).

A fluorescência tem origem, quase exclusivamente, no PSII por isso alterações na sua medição refletem o seu estado de funcionamento. Estes dados também nos informam sobre a taxa de transporte de elétrons, o rendimento quântico e a existência ou não de fotoinibição.

As medições de fluorescência da clorofila foram feitas na Centro para a Biodiversidade e Genómica Integrativa e Funcional (BioFIG) da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL) com o precioso auxílio do Prof. Jorge Marques da Silva. Para estas medições recorreu-se à utilização de um fluorómetro, Heinz Walz - PAM 101 (Pulse Amplitude Modulation), um sistema de aquisição de dados, Heinz Walz - PDA-100, e uma fonte de iluminação, Schott FL-103. Os parâmetros analisados foram o  $F_0$ ,  $F_v/F_m$  e o  $F_m$ .

A definição de  $F_0$  é a fluorescência mínima das culturas. Em termos fisiológicos, é o nível de fluorescência quando o  $Q_A$  (quinona A, primeiro aceitador de elétrons do PSII) está totalmente oxidado. A definição de  $F_m$  é a fluorescência máxima das culturas, fisiologicamente é o nível de fluorescência quando a  $Q_A$  está totalmente reduzida.  $F_v/F_m$  representa a eficiência quântica máxima do PSII (Baker, 2008).

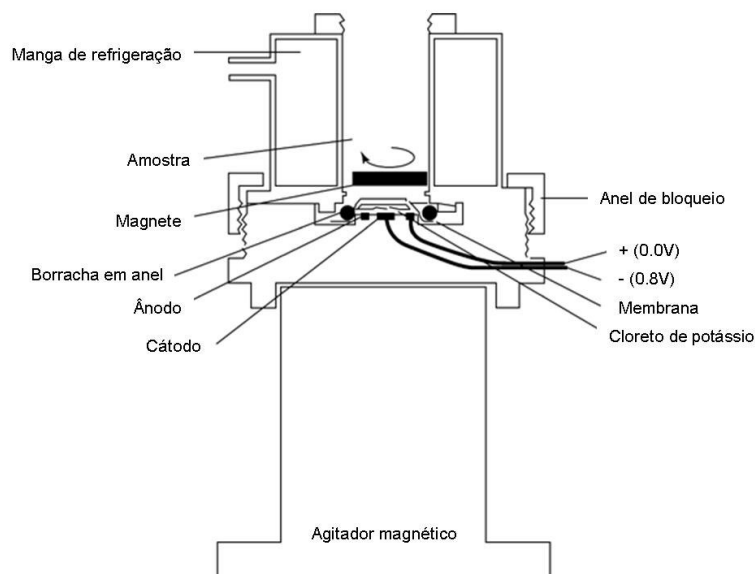
Para as medições da eficiência quântica máxima as culturas de *C. reinhardtii* foram obtidas da mesma forma que para os ensaios bioquímicos. Os tempos de medição foram 0, 24, 48, 72 e 120 horas.

Antes da medição da fluorescência os balões volumétricos foram colocados às escuras durante pelo menos 5 minutos para se poder determinar o valor de  $F_0$ . Todas as medições foram feitas à mesma intensidade luminosa.

### 2.11 Medição da atividade fotossintética (elétrodo de Oxigénio)

O princípio básico de funcionamento de um elétrodo de oxigénio do tipo Clark baseia-se numa corrente elétrica, gerada entre um ânodo e um cátodo, que é proporcional à quantidade de oxigénio presente em solução (Walker, 1993).

O sistema consiste num elétrodo de platina (cátodo), num elétrodo de referência de prata (ânodo) imersos numa solução de cloreto de potássio (eletrólito) e numa fina membrana isolante de teflon ou polietileno permeável ao oxigénio que isola eletricamente a solução a analisar. A membrana é presa por uma borracha em formato de anel (Figura 5).



**Figura 5** – Detalhe ilustrativo da câmara de medição de oxigénio do Oxytherm (elétrodo de oxigénio, Hansatech Instruments).

Quando se polariza negativamente o elétrodo de platina em relação ao elétrodo de referência, o oxigénio dissolvido em solução sofre uma redução eletrolítica ao nível do cátodo, gerando-se uma corrente elétrica de baixa intensidade. Na gama de voltagens de polarização entre -0.4 e -0.7V, a corrente elétrica varia linearmente com a concentração de oxigénio (Walker, 1993).

As culturas de algas utilizadas para a medição da atividade fotossintética cresceram durante 5 dias, em meio líquido, com luz natural, à temperatura de 25°C num agitador orbital (Agitorb 200 IC, Aralab) a 120rpm, até ser atingida a fase estacionária (cerca de 5 dias). Ao 5º dia, acrescentou-se meio acetato (com enxofre) e ao 8º dia fizeram-se as medições recorrendo a um elétrodo de oxigénio (Oxygen electrode, Hansatech Instruments, Oxytherm). Para esta medição foi ainda necessário utilizar um refrigerador (Thermo Haake K10) regulado para os 25°C e uma fonte luminosa que permitiu fazer ciclos de luz/escuras, sendo que à luz os valores de intensidade luminosa foram de  $480,7 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

Na câmara do elétrodo, previamente calibrado, foram colocados 2mL de cultura de células em constante agitação. Cada medição de oxigénio teve a duração de 30 minutos com ciclos de luz/escuras de 5 e 2,5 minutos, respetivamente.

A utilização do elétrodo foi possível no BioFIG-FCUL, com a excelente ajuda do Prof. Dr. João Arrabaça.

### **2.12 Medição do teor de hidrogénio**

A medição do teor de hidrogénio produzido pelas culturas de *C. reinhardtii* foi realizada no Laboratório de Química e Ambiente do Instituto de Soldadura e Qualidade (ISQ), sediado em Oeiras.

Para estas medições, o método laboratorial utilizado foi a cromatografia gasosa (GC – Gas Chromatography). A GC permite separar componentes de uma mistura em componentes individualizados.

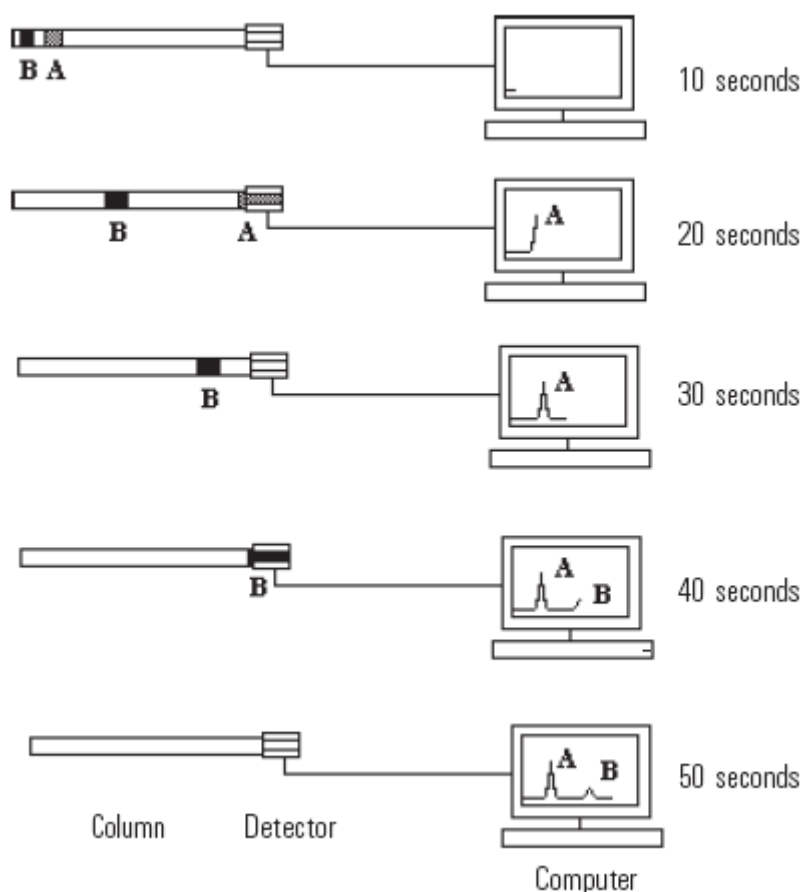
A amostra a ser analisada é adicionada ao gás de arraste (fase móvel), que a transporta através da fase estacionária (coluna cromatográfica que pode conter um líquido ou um sólido). Os constituintes da amostra vão distribuir-se entre as duas fases. Como a capacidade de adsorção e solubilização dos componentes da amostra são diferentes, o tempo que demoram a percorrer a coluna será também diferente (Rood, 1995).

No final da coluna cromatográfica existe um detetor ligado a um computador que indica a saída de cada um dos componentes (Figura 6). Quando um determinado soluto passa pelo detetor é emitido um sinal elétrico que será proporcional à concentração do soluto ou à sua quantidade no gás de arraste.

O cromatógrafo utilizado foi o Micro GC Agilent M200, o gás de arraste foi o árgon e com um detetor de condutividade térmica (TCD – Thermal Conductivity Detector). A amostra gasosa foi aspirada durante 30 segundos pelo injetor para dentro do cromatógrafo.

A escolha do gás de arraste é decisiva para aumentar a eficiência da separação e quantificação dos elementos de uma mistura, existem vários gases passíveis de serem usados nesta técnica são eles o hidrogénio, o hélio, o árgon e o azoto, por exemplo. O gás de arraste deve ser inerte e puro, ou seja, não deve interagir nem com a amostra nem com a fase estacionária, limita-se a arrastar a amostra pela coluna (Roode, 1995). Neste trabalho foi usado o árgon dado que o hidrogénio (gás de arraste mais comum) era o composto que queríamos analisar.





**Figura 6** - Esquema representativo da separação por GC de componentes de uma mistura AB. No momento da injeção da amostra (10 segundos) o que se pode ver no monitor do computador é a linha base do gás de arraste. Aos 20 segundos, os componentes A e B estão totalmente separados na coluna. Aos 30 segundos, pode ver-se no computadores que o componente A já foi eluído da coluna. Aos 50 segundos, toda a mistura saiu da coluna e os picos referentes às componentes A e B são visíveis no cromatograma final (User's Manual - M Series Micro Gas Chromatograph, Agilent, 2000).

### 2.13 Análise estatística

Os dados obtidos neste trabalho foram introduzidos no programa GraphPad Prism 5.2 e foram apresentados os valores referentes à média e ao desvio padrão.

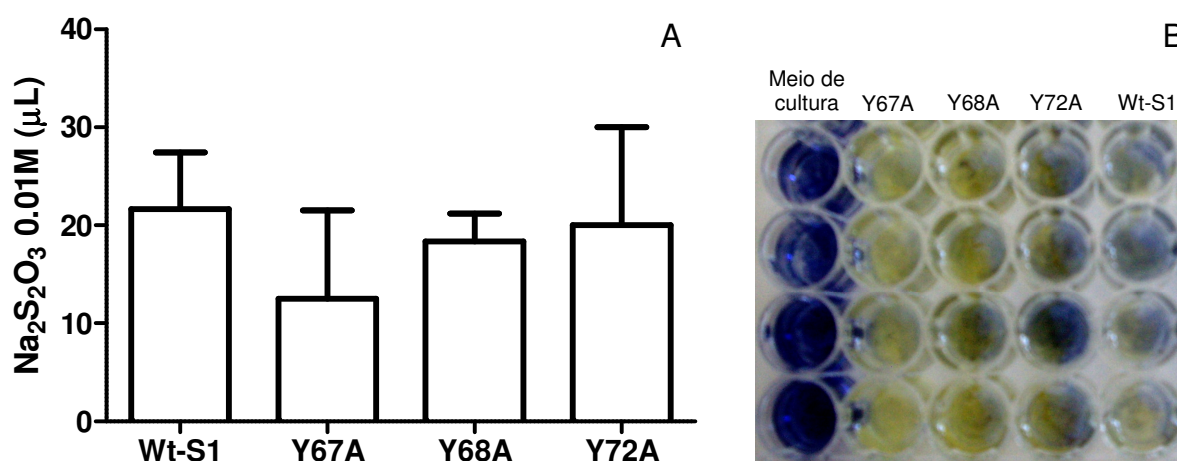
Os dados analisados, pelo programa informático, foram os do crescimento das culturas, do doseamento de clorofilas e das proteínas. Para estes dados optou-se por realizar o teste *two-way ANOVA* porque foi necessário analisar a variabilidade de dois fatores, o tempo e a estirpe (figura 9, 10 e 15) ou o tempo e a presença/ausência de enxofre (figura 11 e 16). Neste trabalho aceitou-se que as diferenças foram significativas quando  $p < 0,05$ .

### 3 Apresentação dos resultados

#### 3.1 Medição do teor de oxigénio no meio de cultura dos mutantes de rubisco tendo em vista a produção de hidrogénio

Numa primeira fase deste trabalho, mediu-se pelo teste de Winkler a quantidade de oxigénio dissolvido num meio de cultura dos diferentes mutantes da rubisco quando expostos à luz. Mutantes de *Chlamydomonas* que libertem teores baixos de oxigénio durante a fotossíntese serão mais eficazes para a produção de hidrogénio dado que o oxigénio inibe a atividade das hidrogenases.

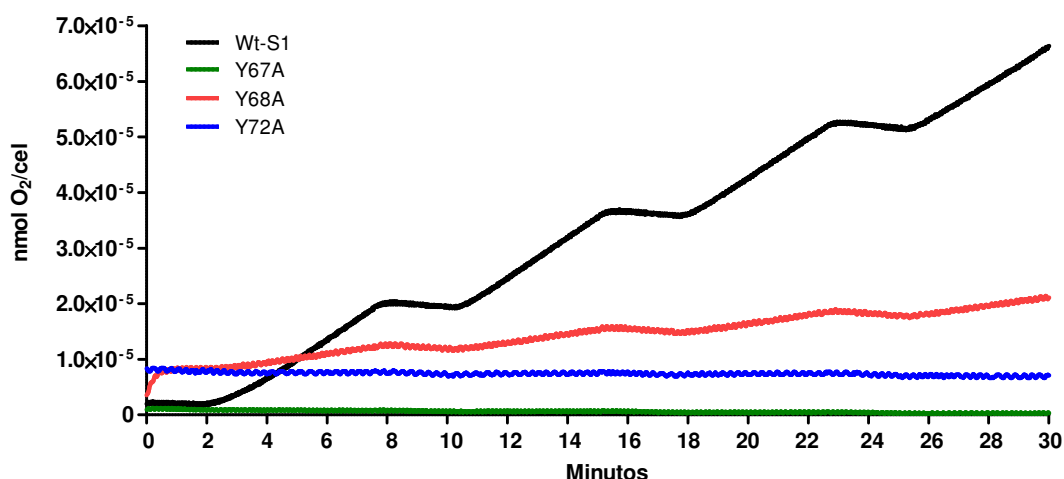
Os resultados obtidos com o teste de Winkler estão representados na figura 7.



**Figura 7** - Volume de tiossulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 0,01M adicionado, durante a titulação efetuada no final do teste de Winkler, aos poços com as culturas dos mutantes Y67A, Y68A e Y72A e do controlo Wt-S1 (A). Fotografia com pormenor da placa durante a titulação do final do teste de Winkler (B). A reação do iodo com o amido confere a coloração azul ao conteúdo dos poços, após a titulação com  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  aparece a cor amarela. Quanto maior a quantidade de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  adicionada, maior a quantidade de oxigénio dissolvido.

Ao observar a figura 7A, pode inferir-se que o mutante com maior probabilidade de produzir maior quantidade de hidrogénio seria o Y67A, dado que após exposição à luz, o meio de cultura tem uma menor quantidade de oxigénio.

Em relação às outras três culturas em estudo, o Y68A, o Y72A e o Wt-S1, as diferenças nos teores de oxigénio dissolvido no meio foram relativamente pequenas, não sendo conclusivos os resultados. Foram então feitas, por um método mais eficaz, as medições do teor de oxigénio produzido à luz pelos mutantes utilizando o eletrodo do tipo Clark, disponível na Faculdade de Ciências de Lisboa.



**Figura 8** – Evolução da atividade fotossintética das culturas dos mutantes Y67A, Y68A e Y72A e do controle Wt-S1. As medições foram feitas com um elétron de oxigénio do tipo Clark a 25°C e com uma iluminação de  $480,7 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Foram feitos ciclos de luz/escuras que se combinaram, consecutivamente, da seguinte forma: 5 minutos de luz, 2,5 minutos de escuras.

Ao observar a figura 8, verificou-se que a produção de oxigénio, pela fotossíntese, dos mutantes foi muito inferior à do controlo. Na curva de evolução do oxigénio produzido, por célula, do controlo e do Y68A foi possível identificar as fases à luz e às escuras. Na fase luminosa a inclinação da reta foi positiva, ou seja, houve uma maior produção de oxigénio do que consumo. Enquanto, na fase às escuras a inclinação da reta foi negativa, ou seja, foi consumido oxigénio.

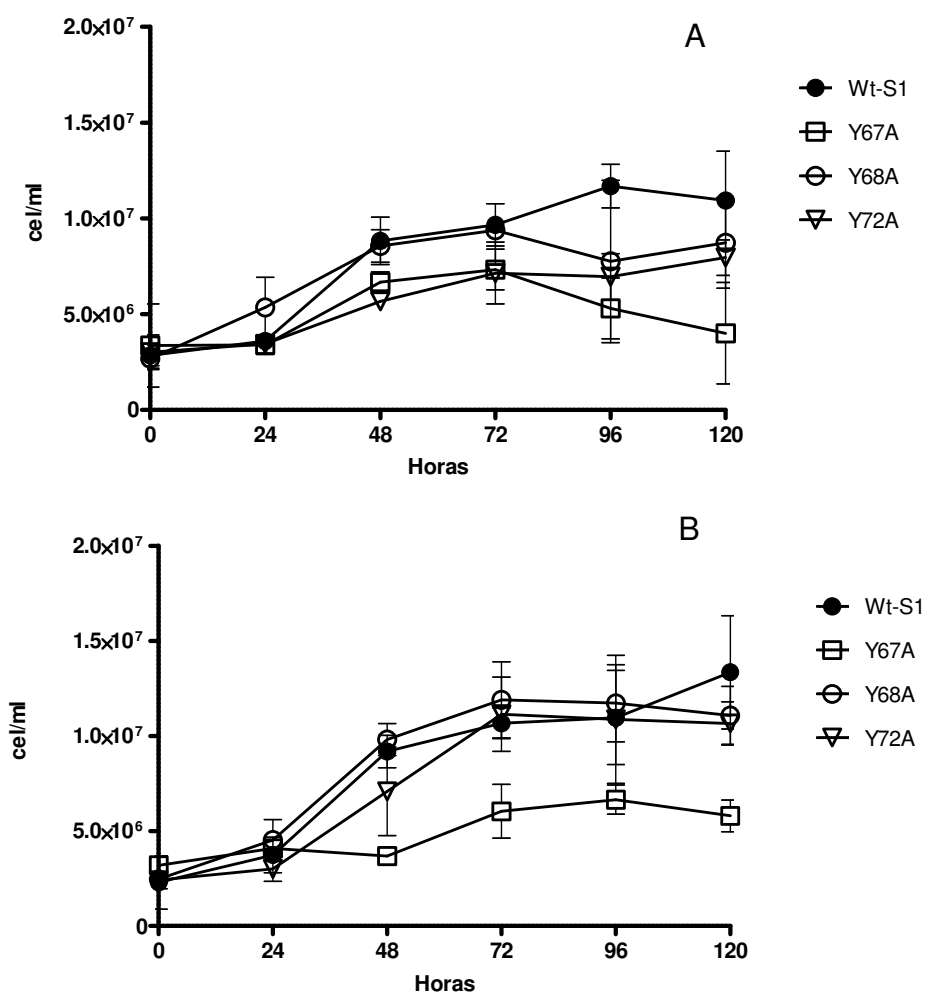
Nos mutantes Y67A e Y72A, as duas fases dos ciclos luz/escuras não se distinguem e as inclinações das retas foram sempre negativas, mostrando que o consumo de oxigénio excedeu sempre a sua produção durante o período de luz.

### 3.2 Comparação fenotípica dos mutantes em meio de cultura completo e sem enxofre

A produção sustentável de hidrogénio à luz requer que as microalgas estejam numa situação de stresse de deficiência de enxofre e em anóxia (Melis *et al.*, 2000) por isso foi feita uma comparação fenotípica dos mutantes crescidos em meio sem enxofre e em meio completo (designado por meio com enxofre) ao longo de vários dias de cultura, sem arejamento. Foram analisados vários parâmetros como o crescimento das culturas, o teor de clorofila, a eficiência fotoquímica máxima, o teor de amido e da proteína total e a expressão de várias proteínas relacionadas com a fotossíntese e a produção de hidrogénio.

### 3.2.1 Crescimento das culturas

Na figura 9 estão representadas as curvas de crescimento, ao longo de 120 horas, das culturas dos diferentes mutantes crescidas à luz, em meio sem e com enxofre e sem arejamento.



**Figura 9** – Curva de crescimento dos mutantes Y67A, Y68A e Y72A e do controle Wt-S1 em meio de crescimento sem enxofre (A) e com enxofre (B), durante 120 horas.

Ao fazer-se a comparação entre as curvas de crescimento de todos os mutantes verificou-se que seguem um crescimento característico de vários micro-organismos (Pampulha, 1998), ou seja, apresentam 4 fases distintas: a fase *lag* (fase inicial de crescimento muito lento), a fase exponencial (fase de crescimento exponencial), a fase estacionária (fase em que o crescimento se mantém inalterado) e a fase de declínio ou morte (fase de crescimento negativo).

Tanto no meio de crescimento sem enxofre como no meio completo (Figura 9A e B, respetivamente), a fase *lag* foi observada entre as 0 e as 24 horas e a fase exponencial prolongou-se até às 72 horas.

Contudo, após as 72 horas, as células em meio sem enxofre entram em fase de declínio enquanto no meio com enxofre mantêm-se em fase estacionária ou ainda em crescimento, como no caso da estirpe controlo (Wt-S1).

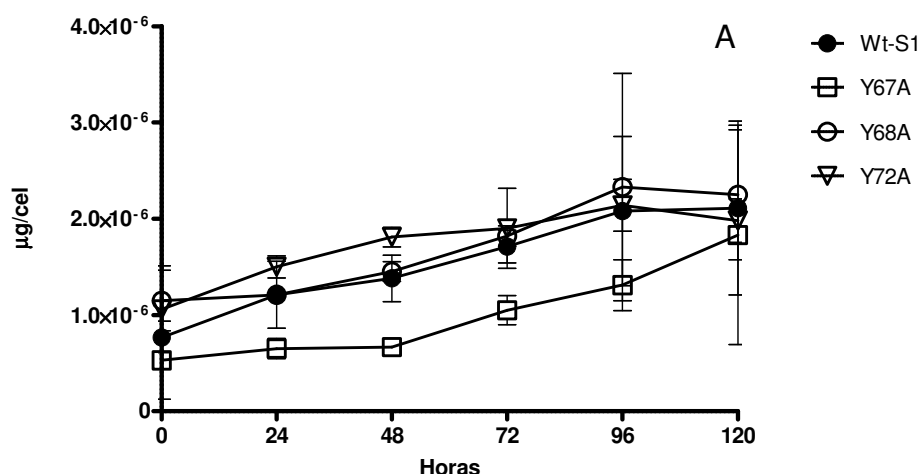
Através dos gráficos da figura 9, foi ainda possível verificar que o mutante com menor crescimento foi o Y67A nos dois tipos de meios de cultura, sendo que esta diferença foi mais notória no meio com enxofre. O controlo foi o que atingiu uma concentração celular mais elevada, tanto no meio com como no sem enxofre.

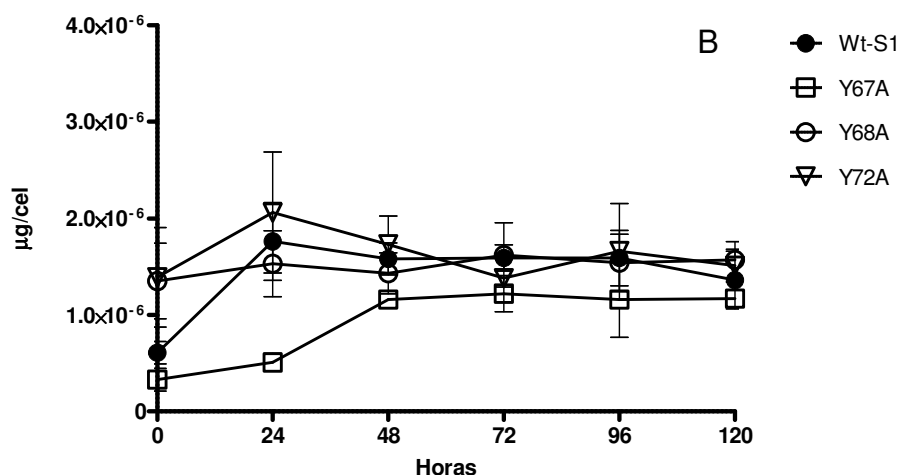
Da análise estatística realizada aos dados do crescimento em meio sem enxofre (Figura 9A), o controlo é significativamente diferente do Y67A às 96 e 120 horas, do Y68A às 96 horas e do Y72A às 48, 96 e 120 horas.

No meio com enxofre (Figura 9B), conclui-se que o controlo é significativamente diferente do mutante Y67A nos tempos 48, 72, 96 e 120 horas.

### 3.2.2 Doseamento de clorofila

Pela análise da figura 10, com os resultados referentes à clorofila total, por célula, de culturas desenvolvidas em meio de crescimento sem enxofre (A) e em meio com (B) enxofre, pode-se constatar que os teores de clorofila máximos obtidos não foram muito diferentes nos dois meios de crescimento estudados. No caso do meio sem enxofre, o valor máximo obtido foi o do mutante Y68A às 96 horas ( $2,33 \times 10^{-6} \mu\text{g/cel}$ ). No meio com enxofre, o valor máximo foi o do mutante Y72A às 24 horas ( $2,06 \times 10^{-6} \mu\text{g/cel}$ ).





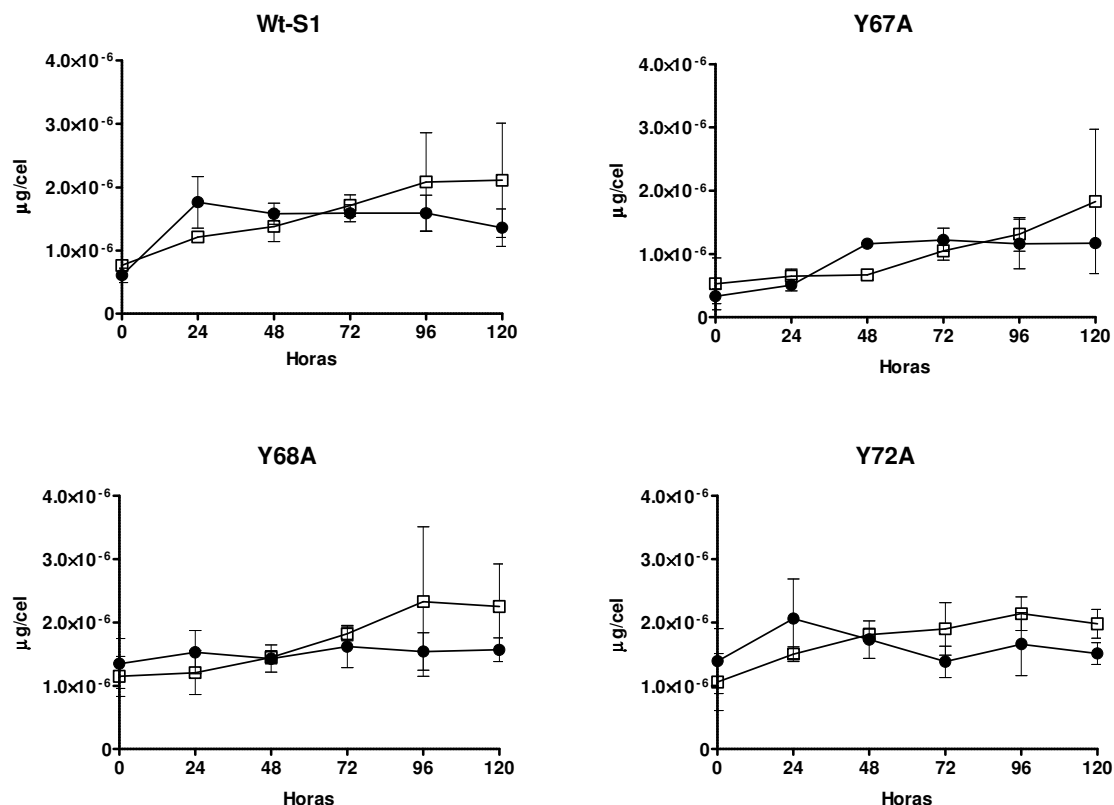
**Figura 10** – Quantidade de clorofila total por célula dos mutantes Y67A, Y68A e Y72A e do controle Wt-S1 durante 120 horas. A – meio de crescimento sem enxofre; B – meio de crescimento com enxofre.

No meio sem enxofre (Figura 10A) verificou-se que a quantidade de clorofila total, por célula, foi sempre aumentando até ao pico das 96 horas e depois houve um ligeiro decréscimo nas 120 horas, em todas as culturas, com exceção da do Y67A que manteve a tendência de aumentar até às 120 horas.

Pelo contrário, no meio com enxofre (Figura 10B), verificou-se um aumento da clorofila total até às 24 horas nas células do controle e dos mutantes Y68A e Y72A e depois mantêm-se relativamente estável, o teor de clorofila por célula até às 120 horas. No caso do Y67A a quantidade de clorofila total, por célula, aumentou até às 48 horas e depois também se mantém fixa até às 120 horas.

O resultado da análise ANOVA, aos dados do meio sem enxofre (Figura 10A), mostrou que o controle não diferiu significativamente de nenhum dos mutantes estudados. No que se refere à análise dos dados do meio com enxofre (Figura 10B), o Wt-S1 foi significativamente diferente do Y67A às 24 horas e do Y68A e do Y72A às 0 horas.

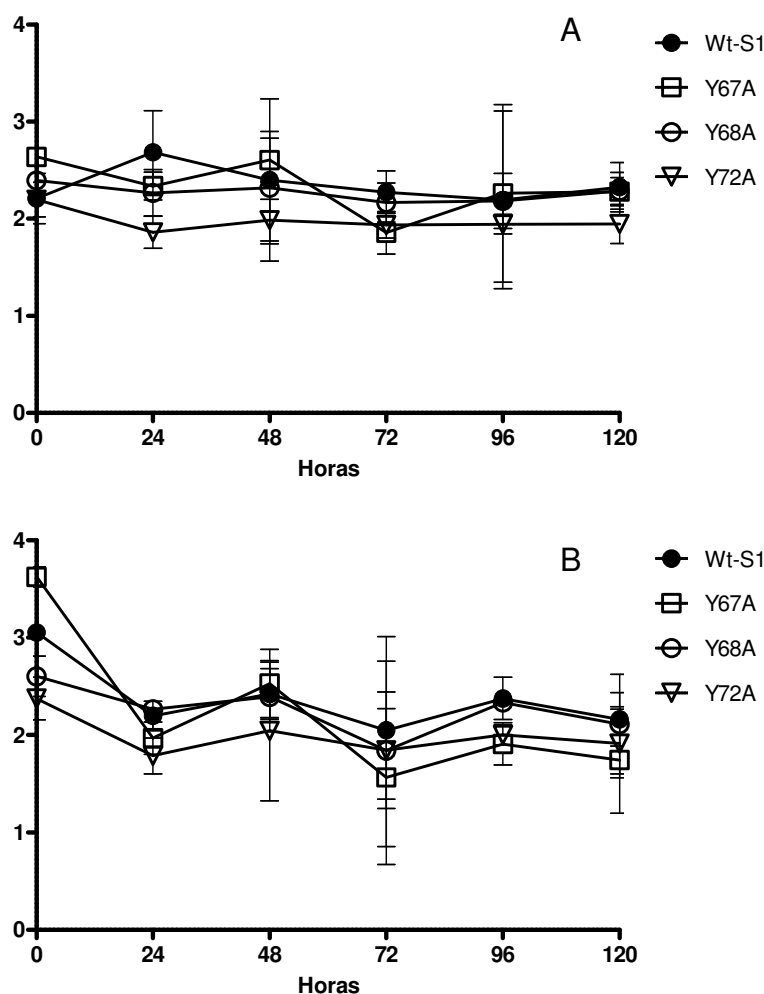
Os gráficos apresentados na figura 11 em seguida permitem uma melhor análise das diferenças da variação da clorofila total, por célula, entre as culturas desenvolvidas em meio de crescimento com e sem enxofre.



**Figura 11** – Comparação da quantidade de clorofila, por célula, dos mutantes Y67A, Y68A e Y72A e do controle Wt-S1 quando as culturas se desenvolvem em meio com (círculos pretos) e sem (quadrados brancos) enxofre.

De um modo geral, pode inferir-se que a quantidade de clorofila total, por célula, nas culturas desenvolvidas em meio com enxofre (círculos pretos) aumenta menos do que nas de sem enxofre (quadrados brancos). Pode-se visualizar na figura 11 que às 48 horas em todas as culturas a quantidade de clorofila foi sensivelmente igual tanto no meio completo como no meio sem enxofre, com exceção do Y67A, em que essa semelhança de teores de clorofila se efetua às 72 horas. Após estes tempos, 48 e 72 horas conforme os mutantes, a quantidade de clorofila total, por célula, no meio sem enxofre é maior que no meio com enxofre. Assim, às 120 horas a quantidade de clorofila total, por célula, é sempre superior nas culturas de meio sem enxofre.

Apesar destas diferenças detetadas, o resultado da análise ANOVA mostrou que não existiram diferenças significativas entre os valores de clorofila por célula em meio sem e com enxofre.



**Figura 12** – Razão da clorofila a pela clorofila b dos mutantes Y67A, Y68A, Y72A e do controle Wt-S1. A – meio de crescimento sem enxofre; B – meio de crescimento com enxofre.

Ao quociente entre a quantidade de clorofila a e b, dá-se o nome de razão a/b. A razão a/b nas culturas desenvolvidas em meio sem enxofre (Figura 12A) mantém-se praticamente inalterada durante as 120 horas da experiência, em todos os mutantes e no controle. Os valores da razão a/b entre as diferentes estirpes também não foram muito diferentes.

No que se refere às culturas desenvolvidas em meio com enxofre (Figura 12B), pode observar-se uma maior flutuação dos valores da razão a/b de 24 em 24 horas. No entanto, as curvas não foram muito diferentes das obtidas em culturas desenvolvidas em meio sem enxofre.

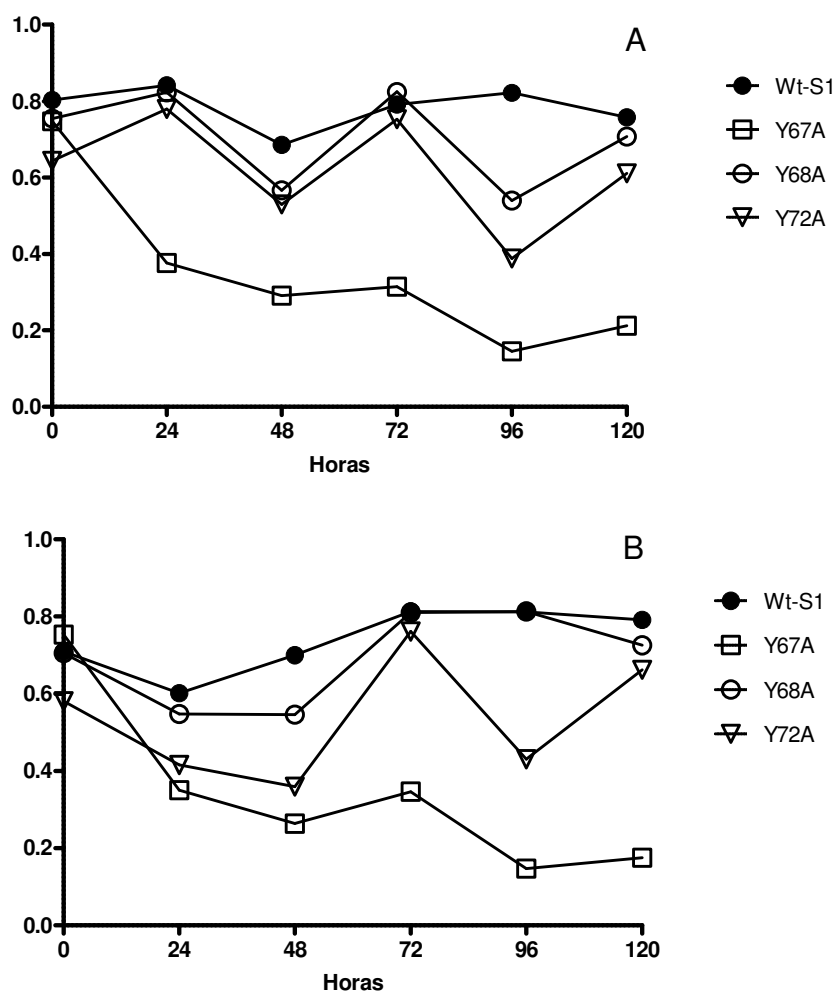
Neste caso, o resultado da ANOVA veio confirmar que não existem diferenças significativas entre os valores apresentados na figura 12.

### 3.2.3 Determinação da eficiência fotoquímica máxima $F_v/F_m$

A fluorescência tem origem nas moléculas de clorofila, dado possuírem uma propriedade que lhes permite reemitirem uma parte da luz absorvida que não é transformada em energia



química pelos organismos. O parâmetro de fluorescência medido foi o  $F_v/F_m$  que nos indica a eficiência do PSII e nos dá uma noção da eficiência fotossintética das culturas.



**Figura 13** – Variação da eficiência fotoquímica máxima em células das estirpes mutantes Y67A, Y68A e Y72A e do controle Wt-S1, durante 120 horas. A - meio de crescimento sem enxofre; B – meio de crescimento com enxofre.

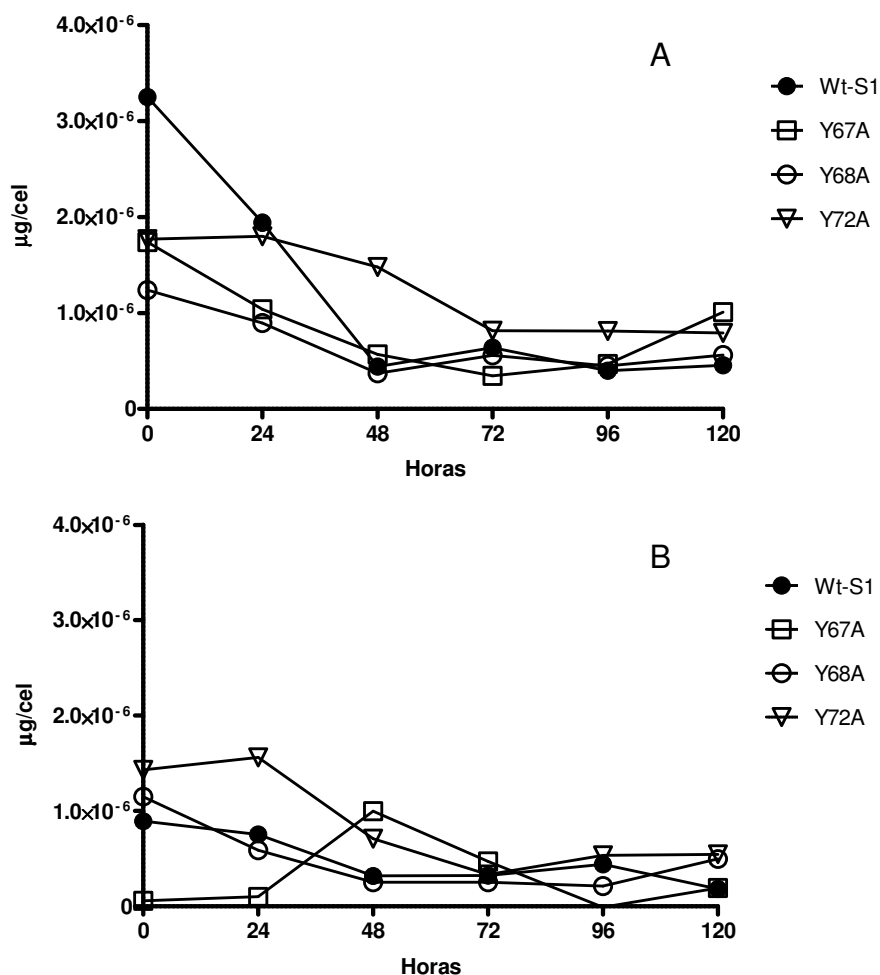
Pela figura 13, pode-se verificar que as células controle apresentam sempre uma eficiência fotoquímica máxima superior à dos mutantes da rubisco. Os valores de  $F_v/F_m$  mais baixos foram sempre obtidos com o mutante Y67A.

Nas culturas desenvolvidas em meio sem enxofre (Figura 13A), observou-se nas primeiras 24 horas um aumento da eficiência fotoquímica máxima em todas as estirpes exceto a Y67A que diminuiu acentuadamente. Após este tempo, o controle apresentou valores constantes de  $F_v/F_m$  ao longo das 120 horas de experiência. Quanto aos mutantes Y68A e Y72A, tiveram algumas variações, de salientar uma diminuição às 48 e às 96 horas. Nas culturas em meio com enxofre (Figura 13B) observou-se nas primeiras 48 horas um decréscimo da eficiência fotoquímica máxima em todas as estirpes exceto no controle que após as 24 horas começa a aumentar os seus valores de  $F_v/F_m$ . Das 72 horas até ao fim do ensaio os valores de  $F_v/F_m$  mantêm-se elevados em todas as estirpes com exceção do Y67A.

É também de notar que no controlo e nos mutantes Y67A e Y68A, os valores iniciais (0 horas) de  $F_v/F_m$  nas duas condições estudadas, foram idênticos (cerca de 0,750). Enquanto o Y72A apresentou valores mais baixos (cerca de 0,600).

### 3.2.4 Doseamento de amido

Os teores de amido obtidos estão apresentados na figura 14.

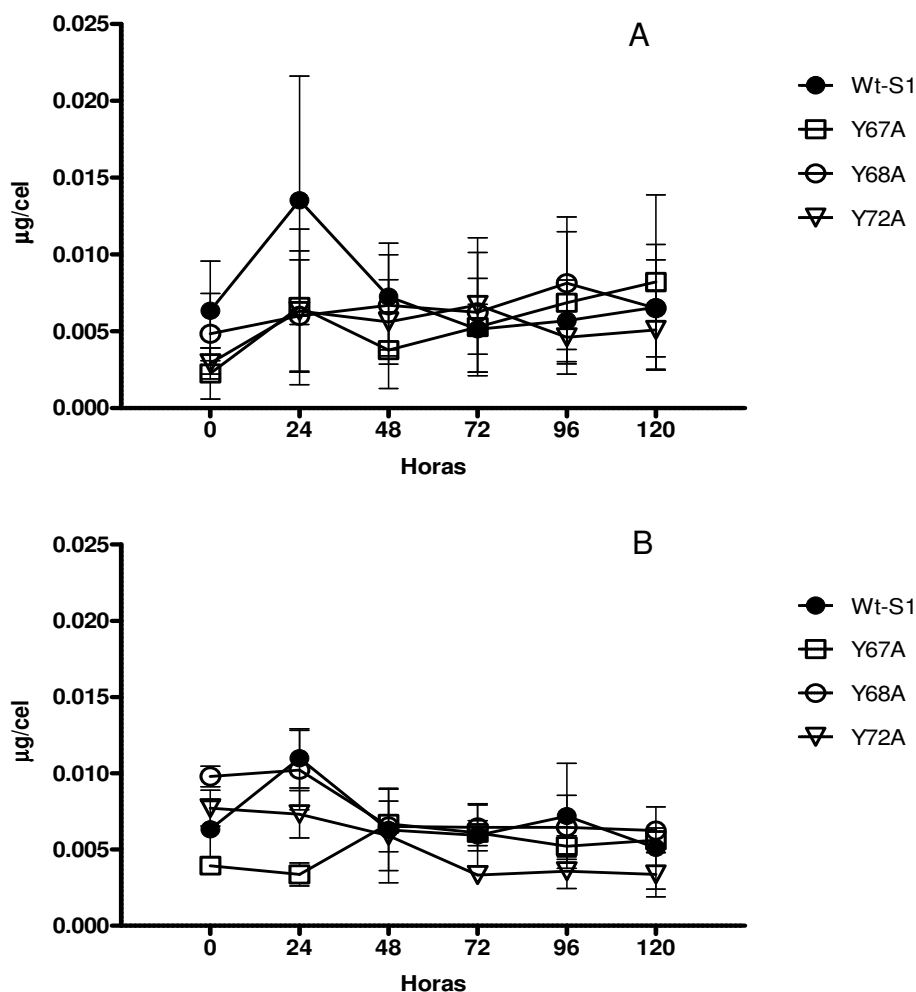


**Figura 14** – Doseamento do amido por célula das culturas de Y67A, Y68A, Y72A e do controlo Wt-S1. A – meio sem enxofre; B – meio com enxofre.

Após uma análise da figura 14A, pode verificar-se que no meio sem enxofre houve uma diminuição acentuada da quantidade de amido por célula em todas as estirpes estudadas, entre as 0 e as 48 ou 72 horas. Após este tempo, o teor de amido permaneceu baixo até ao fim do ensaio (120 horas). No meio com enxofre (Figura 14B), o teor de amido nas células manteve-se praticamente estável nas primeiras 24 horas e depois também diminuiu até às 48 ou 72 horas conservando-se baixo até ao fim do ensaio. Não se encontram diferenças evidentes entre cada uma das estirpes.

### 3.2.5 Doseamento de proteínas

A quantificação proteica foi feita em culturas inoculadas em meio de crescimento com e sem enxofre, e mantidas sem arejamento durante toda a experiência.

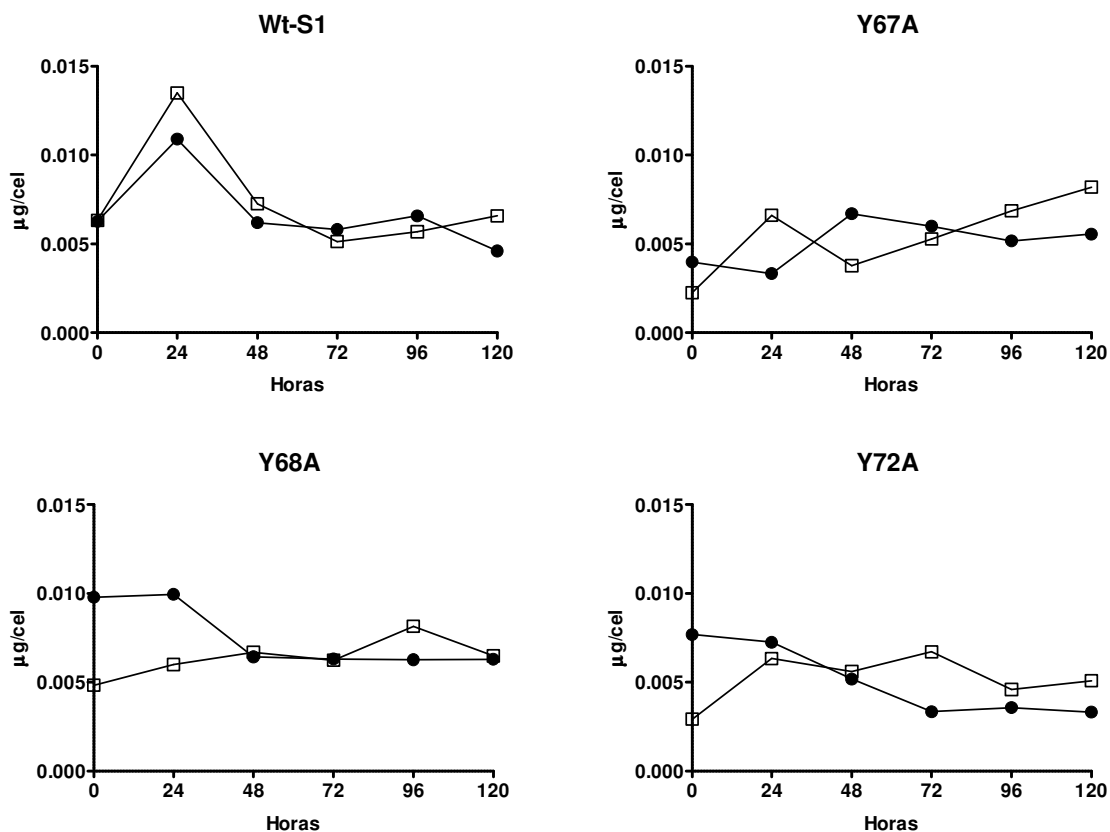


**Figura 15 –** Doseamento de proteínas por célula dos mutantes Y67A, Y68A, Y72A e do controlo Wt-S1. A – meio de crescimento sem enxofre; B – meio de crescimento com enxofre.

A quantidade de proteína por célula, nas culturas em meio sem enxofre (Figura 15A), aumentou acentuadamente nas primeiras 24 horas em todas as culturas à exceção do Y68A. Este aumento no teor proteico nas primeiras 24 horas do ensaio não se verifica nas culturas dos mutantes da rubisco em meio com enxofre (Figura 15B). Das 24 para as 48 horas, assistiu-se a uma descida no teor de proteína total para valores ligeiramente superiores aos iniciais em ambos os meios de cultura. A partir desse tempo e até ao final (120 horas) os teores proteicos mantiveram-se praticamente estáveis tanto nas culturas de meio completo como sem enxofre.

Da análise estatística efetuada aos dados do teor de proteína por célula, em meio sem enxofre (Figura 15A), poderemos dizer que não houve diferenças significativas entre o controlo e os mutantes em todos os tempos analisados. A única exceção foi o tempo das 24 horas entre o controlo e o mutante Y68A.

A figura 16 permite-nos comparar a evolução da quantidade de proteína por célula, de cada estirpe, em meio sem e com enxofre.



**Figura 16** – Comparação da quantidade de proteína, por célula, dos mutantes Y67A, Y68A e Y72A e do controlo Wt-S1 quando as culturas se desenvolvem em meio com (círculos pretos) e sem (quadrados brancos) enxofre.

Na figura 16 não foi possível observar diferenças entre as curvas de quantificação de proteína por célula em meio sem e com enxofre, em todas as culturas estudadas. Essa observação foi confirmada pelo resultado da análise estatística, que mostrou não existirem diferenças significativas entre essas duas curvas. Contudo é de notar um pequeno aumento da proteína total, ao longo do tempo, na estirpe mutante Y67A no meio sem enxofre. Nas outras estirpes mutantes o teor de proteína total parece estável ou diminuir muito ligeiramente.

### 3.2.6 Expressão das proteínas relacionadas com a fotossíntese e com a produção de hidrogénio

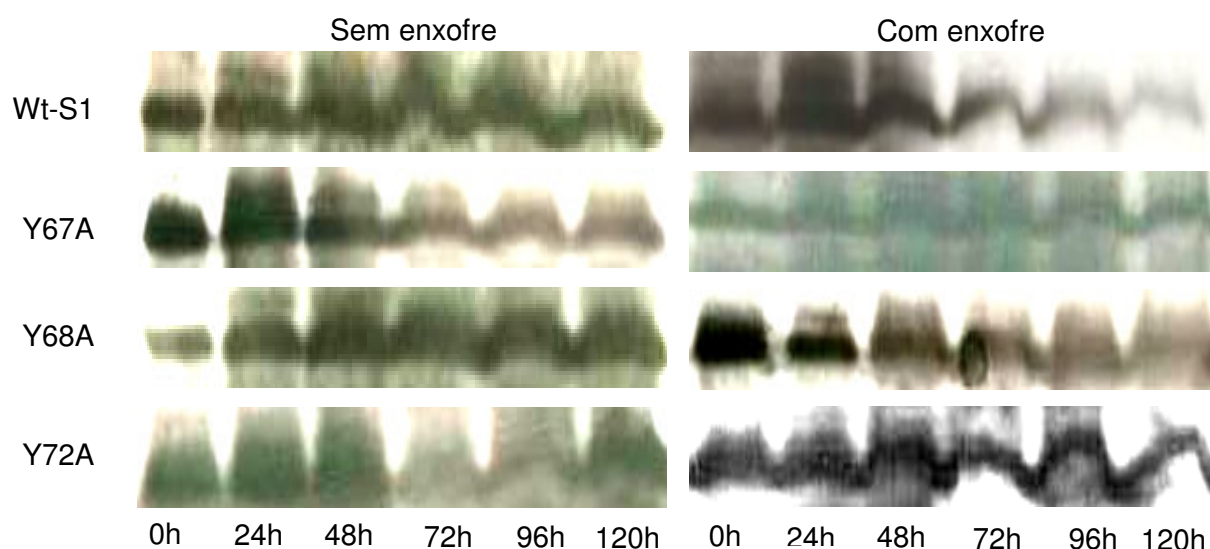
Neste trabalho foi analisada a evolução da expressão proteica de quatro proteínas relacionadas com a fotossíntese e com a produção de hidrogénio. As proteínas estudadas foram a Lhcb1, a PsbA (mais conhecida por D1), a rubisco e a hidrogenase.

Durante os ensaios foram retiradas amostras nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas e preparadas para eletroforese em condições desnaturantes, para posterior detecção por colorimetria ou quimioluminescência.

### 3.2.6.1 Lhcb1

O maior complexo antena dos eucariotas fotossintéticos, o LHCII (Light Harvesting Complex II), está localizado na membrana do tilacoide do cloroplasto fazendo parte do fotossistema II. É um complexo proteico formado por 3 tipos diferentes de proteínas que se ligam a várias moléculas de clorofila, são elas as Lhcb1, as Lhcb2 e as Lhcb3. A Lhcb1 é a proteína mais abundante neste complexo e é codificada por vários genes nucleares. Este complexo desempenha um papel fundamental porque capta a energia luminosa, necessária para a fotossíntese, e regula o fluxo energético no aparelho fotossintético (Standfuss e Kühlbrandt, 2004).

A figura 17 mostra o padrão de evolução da quantidade de proteína Lhcb1, com cerca de 25kDa, nas culturas em meio sem e com enxofre a diferentes horas da experiência de produção de hidrogénio.



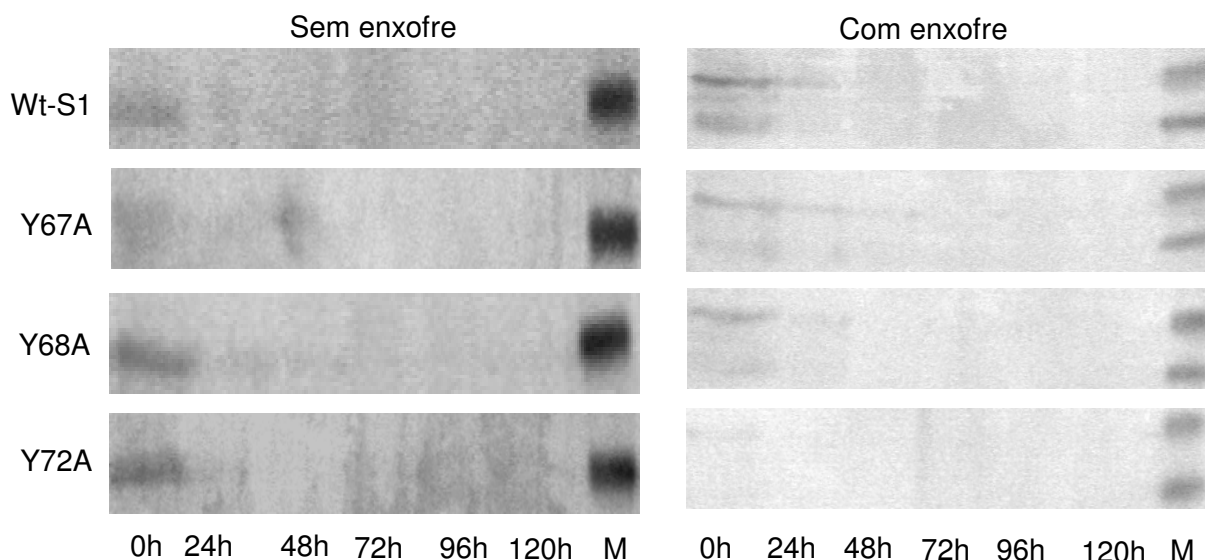
**Figura 17** – Evolução da quantidade da proteína Lhcb1 durante a experiência de produção de hidrogénio dos mutantes Y67A, Y68A, Y72A e do controlo Wt-S1. Chapas fotográficas impressas (30 segundos) por membranas de PVDF reveladas por quimioluminescência, com amostras recolhidas a diferentes tempos (0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas). Quantidade de amostra por poço, 15µL para todas as estirpes.

Pode-se observar que a quantidade da proteína Lhcb1 manteve-se mais estável durante o ensaio sem enxofre do que no meio completo. É de notar que a partir das 72 horas a degradação intensificou-se sendo esta mais elevada nas condições de meio com enxofre. No entanto, às 120 horas foi sempre possível visualizar a banda referente a esta proteína.

Em ambas as condições de cultura, foi possível identificar o aparecimento de uma banda de cerca de 30kDa às 24 horas tanto no controlo como nos mutantes. No entanto, este polipéptido, também sofreu uma degradação em todas as estirpes e às 120 horas não foi possível visualizá-lo. Outra particularidade do polipéptido de 30kDa, no controlo degradou-se até às 48 horas e nos mutantes foi possível observá-lo até às 72 horas.

### 3.2.6.2 PsbA (D1)

A proteína PsbA (D1), com cerca de 28kDa de massa molecular faz parte do centro de reação do fotossistema II um dos complexos chave da cadeia transportadora de eletrões na fotossíntese e portanto está também relacionada com a produção de hidrogénio. A figura 18 apresenta os *immunoblots* obtidos para avaliar o padrão de evolução da quantidade da proteína PsbA, nas culturas dos mutantes Y67A, Y68A, Y72A e do controlo Wt-S1 em meio sem enxofre e em meio completo, durante 120 horas.



**Figura 18** – Evolução da quantidade da proteína PsbA durante a experiência de produção de hidrogénio dos mutantes Y67A, Y68A, Y72A e do controlo Wt-S1. Membranas de PVDF reveladas por colorimetria com amostras recolhidas a diferentes tempos (0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas). Quantidade de amostra por poço, 20µL para todas as estirpes; Marcador (M) - 5 µL. A banda do marcador que aparece na imagem é de 35kDa (meio sem enxofre) e de 35 e 27kDa (meio com enxofre).

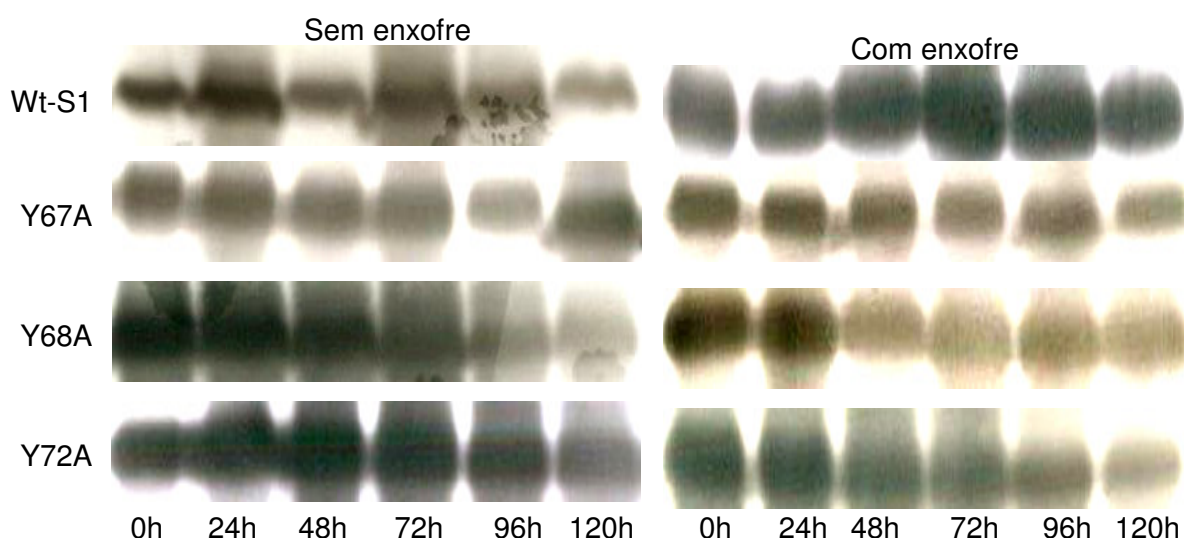
No padrão de degradação da proteína PsbA em meio sem enxofre e com enxofre foi possível detetar algumas diferenças.

Nas culturas em meio sem enxofre (Figura 18, lado esquerdo), a partir das 24 horas não foi possível observação a proteína PsbA, ou seja, a degradação foi muito intensa e rápida. Nas culturas em meio completo (Figura 18, lado direito), a degradação da proteína PsbA também foi intensa mas ocorreu em tempos diferentes consoante as estirpes analisadas. No controlo e no mutante Y68A, às 48 horas de ensaio, a proteína parece estar completamente degradada. No mutante Y67A, a banda correspondente à proteína PsbA é visível até às 48

horas e depois desse tempo deve ter ocorrido uma degradação intensa pois deixa de ser visível no *immunoblot*. O Y72A em meio com enxofre apresentou um padrão de degradação idêntico ao do meio sem enxofre.

Para além disto, a proteína PsbA apenas apresentou uma banda visível, com cerca de 28kDa, nas culturas em meio sem enxofre. E, no meio com enxofre, apareceram duas bandas referentes à massa molecular de 28 e 38kDa, aproximadamente.

Dado o método quimioluminescente para a deteção de proteínas ser mais sensível que o colorimétrico, estes *immunoblots* foram repetidos utilizando esta técnica (Figura 19).

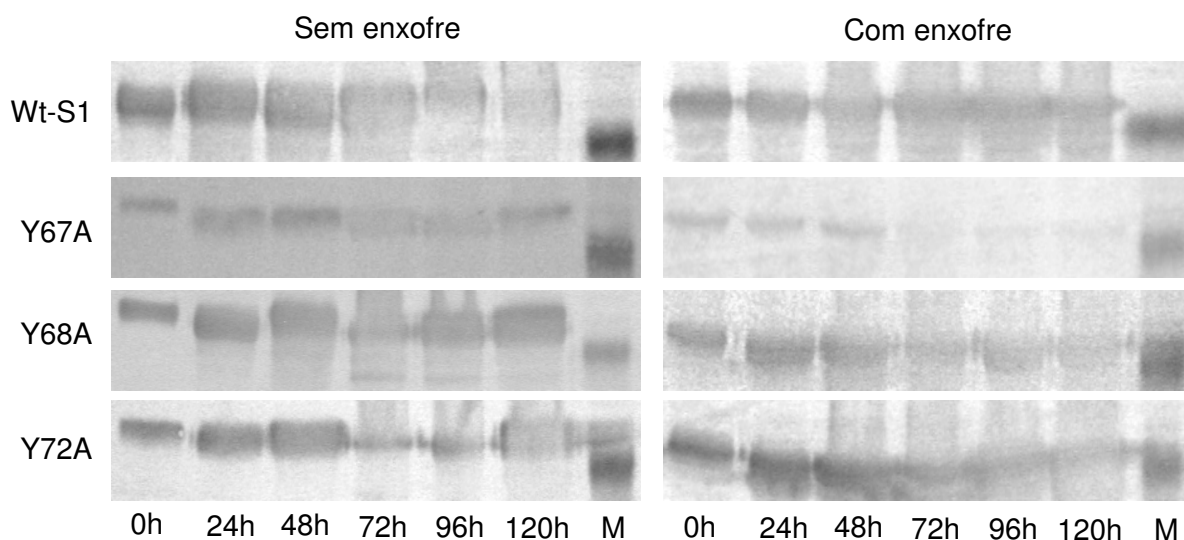


**Figura 19** – Evolução da quantidade da proteína PsbA durante a experiência de produção de hidrogénio dos mutantes Y67A, Y68A, Y72A e do controlo Wt-S1. Chapas fotográficas impressionadas (10 segundos) por membranas de PVDF reveladas por quimioluminescência, com amostras recolhidas a diferentes tempos (0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas). Quantidade de amostra por poço, 5µL para todas as estirpes.

Da observação da revelação das chapas fotográficas (Figura 19), verificou-se mais uma vez uma degradação da proteína D1 no decorrer da experiência, quer no meio sem enxofre quer no meio completo. Nesta revelação não foi possível visualizar, no meio completo, o aparecimento do polipéptido de 28kDa. Isto pode ser devido ao elevado *background* da revelação da chapa fotográfica. O controlo, em meio sem enxofre, mostrou ser a estirpe em que a degradação da proteína D1 foi mais pequena.

### 3.2.6.3 Rubisco

Na figura 20 estão representados os *immunoblots* da subunidade grande da rubisco, com cerca de 55kDa (Spreitzer e Salvucci, 2002), nas culturas com meio sem e com enxofre a diferentes horas da experiência de produção de hidrogénio.



**Figura 20** – Evolução da quantidade de rubisco durante a experiência de produção de hidrogénio dos mutantes Y67A, Y68A, Y72A e do controlo Wt-S1. Membranas de PVDF reveladas por colorimetria com amostras recolhidas a diferentes tempos (0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas). Quantidade de amostra por poço: Wt-S1 – 2,5µL; Y67A – 5 µL; Y68A – 2,5 µL; Y72A – 5 µL; Marcador (M) - 5 µL. A banda do marcador que aparece na imagem é de 52kDa.

O padrão de evolução da quantidade de rubisco foi muito diferente no meio sem enxofre comparado com o meio com enxofre. No meio sem enxofre nas primeiras 48 horas houve um acentuado aumento desta proteína em todas as estirpes.

Após este aumento inicial, a proteína sofreu uma intensa degradação visível às 72 horas de experiência e depois manteve-se a níveis baixos até ao final do ensaio. Contudo, nos mutantes, parece haver um ligeiro aumento do teor da rubisco no final do ensaio, às 120 horas.

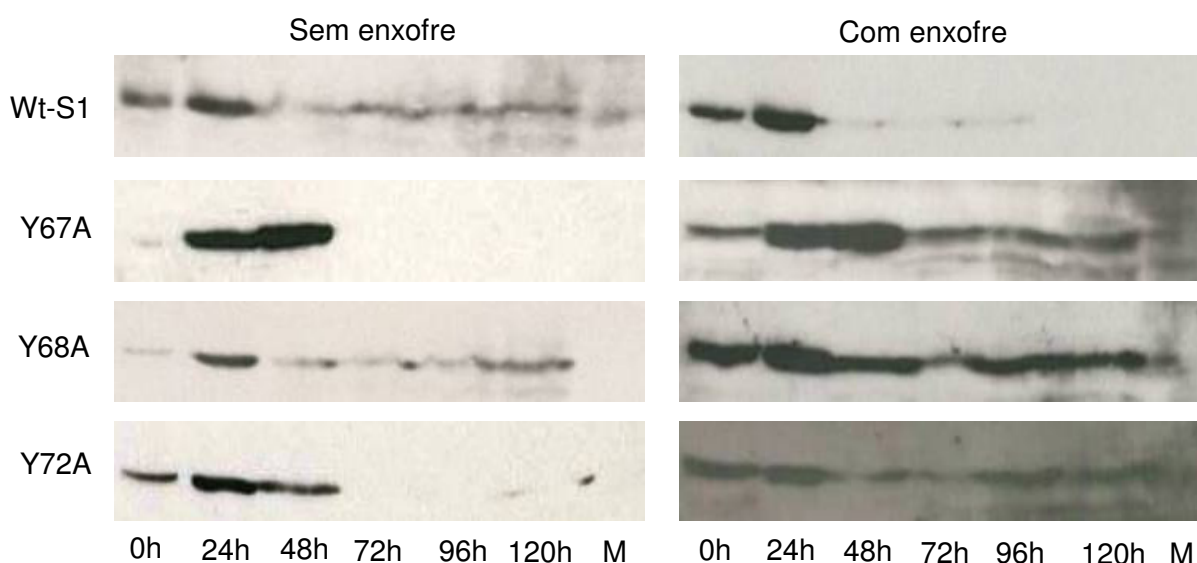
Nas culturas em meio com enxofre, a quantidade de rubisco permaneceu a mesma nas primeiras 48 horas. Às 72 horas de ensaio esta proteína parece sofrer uma ligeira degradação sendo esta mais nítida no mutante Y67A.

Outra observação possível da figura 20, que confirma dados anteriormente publicados (Esquivel *et al.*, 2006), foi que o mutante Y67A e Y72A têm uma menor quantidade de rubisco.

Em alguns dos mutantes foi possível visualizar uma banda de massa molecular inferior à da subunidade grande da rubisco, com cerca de 50kDa. Esta banda de degradação foi visível na cultura de Y68A sem enxofre e nas de Wt-S1, Y68A e Y72A com enxofre.



### 3.2.6.4 Hidrogenase



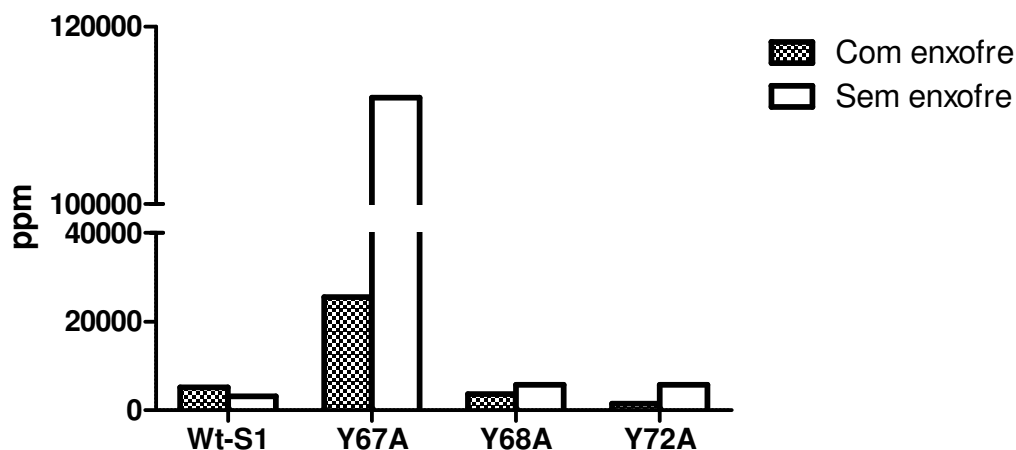
**Figura 21** – Evolução da quantidade da proteína hidrogenase durante a experiência de produção de hidrogénio dos mutantes Y67A, Y68A, Y72A e do controlo Wt-S1. Chapas fotográficas impressas (sem enxofre: Wt-S1 e Y68A – 2 minutos; Y67A e Y72A – 5 minutos / com enxofre: Wt-S1 e Y68A – 10 minutos; Y67A – 2 minutos e Y72A – 5 minutos) por membranas de PVDF reveladas por quimioluminescência, com amostras recolhidas a diferentes tempos (0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas). Quantidade de amostra por poço, 20µL para todas as estirpes; Marcador (M) - 5 µL. A banda do marcador que aparece na imagem é de 52kDa.

Nas culturas em estudo foi possível verificar a existência da proteína responsável pela produção de hidrogénio nas células, a hidrogenase (Figura 21). Contudo o padrão de evolução da hidrogenase foi diferente nas duas condições de ensaio e variou conforme os mutantes.

Foi possível detetar a hidrogenase mesmo às 0 horas, nas duas condições de cultura. O pico de expressão desta enzima deu-se às 24 horas com exceção do mutante Y67A que foi às 48 horas. Depois destes tempos nas culturas sem enxofre existe uma diminuição acentuada da hidrogenase até às 120 horas, o que fez com que a enzima deixasse de ser visível nos *immunoblots*. Pelo contrário, nas culturas em meio com enxofre (Figura 21, lado direito), a partir do pico de expressão máxima da hidrogenase houve uma diminuição lenta dos níveis desta enzima nos mutantes da rubisco sendo visível a sua banda no final do ensaio. E de salientar, que a degradação da hidrogenase foi muito acentuada nas células do controlo após o máximo de expressão das 24 horas.

### 3.3 Determinação do teor de hidrogénio produzido pelos mutantes de *Chlamydomonas* em meio sem enxofre e em meio com enxofre

Para avaliar a quantidade de hidrogénio gasoso produzido pelas culturas de todos os mutantes e do controlo recorreu-se à técnica de cromatografia gasosa, os resultados desta análise estão ilustrados na figura 22 e os valores apresentados na tabela 4.



**Figura 22** – Teor de hidrogénio produzido pelas culturas de Y67A, Y68A, Y72A e Wt-S1 ao final de 72 horas. O crescimento das culturas foi feito em meio acetato com e sem enxofre e em condições de hipoxia.

Os teores de hidrogénio foram obtidos após 72 horas de cultura, em meio com e sem enxofre e em hipoxia. Os resultados mostram que em geral as culturas em meio sem enxofre produzem mais hidrogénio do que as de com enxofre.

**Tabela 4** – Teor de hidrogénio (em ppm, em mL H<sub>2</sub>/L cultura e em mL H<sub>2</sub>/g clorofila) produzido pelas culturas de Y67A, Y68A, Y72A e Wt-S1, decorridas 72 horas de ensaio, em meio de cultura sem enxofre e completo, em condições de hipoxia.

Produção de hidrogénio		Wt-S1	Y67A	Y68A	Y72A
Sem enxofre	ppm	3205	111967	5771	5788
	mL H <sub>2</sub> /L cultura	1,00	35,00	1,80	1,81
	mL H <sub>2</sub> /g clorofila	65,49	4492,94	10,56	13,86
Com enxofre	ppm	5208	25535	3732	1458
	mL H <sub>2</sub> /L cultura	1,63	7,98	1,17	0,46
	mL H <sub>2</sub> /g clorofila	9,61	1096,15	6,21	3,04

O Y67A foi o mutante que mais produziu hidrogénio em quantidades muito superiores aos outros mutantes tanto na cultura em meio sem como com enxofre. A produção de hidrogénio do Y67A em cultura de meio sem enxofre é 4 vezes superior do que em meio com enxofre. Também os mutantes Y68A e Y72A, em meio sem enxofre, apresentam uma maior produção de hidrogénio que o controlo em termos de volume de cultura.

## 4 Discussão dos resultados

A produção de hidrogénio à luz a partir de microalgas é conhecida há muitos anos (Gaffron e Rubin, 1942). No entanto, a quantidade produzida era pequena e de curtíssima duração porque as hidrogenases responsáveis pela libertação de  $H_2$  são altamente inibidas pelo oxigénio (Hemschemeier *et al.*, 2009). Em 2000, foi proposto com sucesso a utilização de meio de crescimento sem enxofre para a produção sustentável de hidrogénio (Melis *et al.*, 2000) dado que a ausência deste constituinte produz uma específica inativação do fotossistema II, que é responsável pela libertação de oxigénio na fotossíntese (Melis, 2002). Por outro lado, a libertação de hidrogénio exige gasto de poder redutor que geralmente é utilizado no ciclo de Calvin na redução dos açúcares sendo a rubisco uma das enzimas chave deste ciclo. A microalga *Chlamydomonas reinhardtii* apresenta uma enorme flexibilidade metabólica que lhe permite uma facilidade de adaptação a condições de aerobiose, hipoxia e anóxia em diversos ambientes e é considerada a alga modelo para a produção de hidrogénio (Esquível *et al.*, 2011). Tendo por base estas constatações, foram usados dois meios de cultura, sem e com enxofre, induzida hipoxia, e fez-se uma caracterização e comparação bioquímica detalhada de três mutantes da rubisco de *C. reinhardtii* com a finalidade de conhecer as suas características com vista ao aumento da produção de hidrogénio em relação a uma estirpe controlo.

Dado que a hidrogenase, enzima essencial para a produção de hidrogénio, apenas é expressada e mantém-se ativa em condições de anaerobiose (Hemschemeier *et al.*, 2009), os mutantes desejados são aqueles em que a taxa fotossintética seja no mínimo, igual à respiração para que todo o oxigénio produzido seja consumido. Pela medição da capacidade fotossintética (Figura 8), através de um eléctrodo de oxigénio, verificou-se que os mutantes Y67A e Y72A seriam uns bons candidatos para um aumento da produção de hidrogénio porque a quantidade de oxigénio produzida pelos dois mutantes foi muito pequena, quase nula. Assim, nas culturas de Y67A e Y72A à luz as condições de hipoxia serão atingidas rapidamente e manter-se-ão ao longo da experiência possibilitando uma maior produção de hidrogénio, dado não existir uma inibição da hidrogenase pelo oxigénio produzido durante a fotossíntese. Com efeito, trabalhos anteriores revelaram que a enzima rubisco, destes dois mutantes, era muito instável devido à substituição de resíduos de tirosina por alanina na interface entre subunidades (Esquível *et al.*, 2006), indicando que teriam a capacidade fotossintética afetada. Pelas curvas de crescimento dos vários mutantes em meio completo à luz (Figura 9) também se verificou que o mutante Y67A teve dificuldade em crescer mostrando uma alteração na sua capacidade fotossintética. Quanto ao Y72A foi só notório apenas um ligeiro atraso no crescimento às 48 horas.

Pela caracterização bioquímica, confirmou-se que os mutantes Y67A e Y72A têm uma menor quantidade de rubisco (Figura 20). O facto de estes mutantes terem uma deficiente capacidade fotossintética e uma menor quantidade de rubisco, faz com que o ciclo de Calvin funcione mais lentamente, diminuindo assim a utilização do poder redutor da fotossíntese. Deste modo este poder redutor (NADPH) poderá estar mais disponível para ser utilizado na redução da ferredoxina que irá ceder eletrões para a produção de hidrogénio através das hidrogenases (Melis *et al.*, 2000).

Verificou-se também que os mutantes Y67A e Y72A, no meio sem enxofre (Figura 21), apresentam níveis de hidrogenase muito mais elevados do que o Y68A, e do que o controlo, um outro indicativo que serão apropriados para a produção de hidrogénio.

Relativamente às culturas desenvolvidas em meio de crescimento sem enxofre, ao longo do tempo da experiência (120h) foram registadas alterações significativas nos teores de proteína, da rubisco, da clorofila e de amido como descrito na literatura para as células controlo (White e Melis, 2006; para revisão ver Melis, 2007).

Em termos quantitativos os valores, obtidos para a clorofila e proteína total podem ser considerados normais uma vez que outros trabalhos realizados (Melis *et al.*, 2000; Torzillo *et al.*, 2009) apresentam valores de clorofila e proteína idênticos aos apresentados neste estudo. A concentração de clorofilas não foi muito afetada pela presença ou ausência de enxofre do meio de cultura, o que já tinha sido apresentado em trabalhos anteriores (revisto por Antal *et al.*, 2010).

No que diz respeito ao padrão de degradação da rubisco, todos os estudos indicam um declínio substancial na quantidade de rubisco na ausência de enxofre no meio de cultura em função do tempo (Melis, 2007; Ghysels e Franck, 2010). Segundo White e Melis (2006), numa cultura da estirpe selvagem, em meio sem enxofre à luz ( $200\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), a subunidade grande da rubisco sofre uma degradação quase completa a partir das 48 horas. Neste trabalho (Figura 20) também se verificou uma intensa degradação a partir das 72 horas. Contudo há um ligeiro aumento desta enzima nas primeiras horas do ensaio mostrando haver inicialmente uma síntese proteica usando aminoácidos já existentes nas células. No meio com enxofre a rubisco mantém-se estável na primeira fase do ensaio sofrendo depois uma ligeira degradação após as 72 horas.

Quanto à proteína Lhcb1 que contem as moléculas de clorofila e é um constituinte essencial do PSII verifica-se que não foi afetado pelas condições impostas (meio de crescimento e ausência de arejamento) durante as 120 horas de experiência (Figura 17), o que está de acordo com o facto de não se ter notado grandes alterações nos teores de clorofila (Figura 10), o mesmo foi verificado por White e Melis (2006). Para além disso, foi visível nas chapas fotográficas (Figura 17) que a proteína LhcII é mais abundante nas células que cresceram

com deficiência de enxofre. Esta característica já tinha sido observada (revisto por Antal *et al.*, 2010) no entanto, o papel desta modificação estrutural ainda não está esclarecido.

A variável  $F_v/F_m$  tem por definição a eficiência quântica máxima do PSII e fisiologicamente representa a eficiência máxima a que a luz absorvida pelo PSII é usada para reduzir a plastoquinona A ( $Q_A$ ), primeiro aceitador de eletrões provenientes do PSII. Quando o PSII está em pleno funcionamento considera-se o valor de 0,8 como referência. Quando o PSII é danificado, por exemplo por algum stresse abiótico, os valores obtidos para a variável  $F_v/F_m$  começam a diminuir. A partir de valores inferiores a 0,4 considera-se que o PSII sofreu danos irreversíveis e os organismos fotossintéticos deixam de obter energia pela cadeia acíclica de eletrões (Baker, 2008). Assim, a figura 13 permite-nos perceber que a eficiência fotoquímica máxima das culturas não sofreu grandes variações ao longo dos ensaios na estirpe controlo estudada. Contudo, a eficiência fotossintética das culturas do mutante Y67A diminuiu acentuadamente ao longo dos ensaios, esta diminuição poderá ser justificada pela degradação acentuada da proteína D1 do PSII observada nos *immunoblots* (figura 18 e 19). Enquanto a eficiência fotossintética das culturas dos mutantes Y68A e Y72A decresceu, o que evidenciou alguns danos no PSII mas que foram sendo reparados nos tempos finais da experiência. Um trabalho, recentemente publicado, relacionou um aumento súbito de produção de hidrogénio com um decréscimo acentuado do valor de  $F_v/F_m$  e do teor de proteínas total (Antal *et al.*, 2010; Degrenne *et al.*, 2011). De facto, neste trabalho os valores de  $F_v/F_m$  nas culturas de Y67A, em meio completo e sem enxofre, diminuíram logo às 24 horas seguida por uma redução do teor proteico.

A proteína PsbA (vulgarmente conhecida por D1) pertence ao PSII, faz parte do heterodímero D1/D2, e tem um papel muito importante em todo o processo fotossintético. Uma característica deste heterodímero do centro de reação do PSII, é o rápido catabolismo da proteína D1. Por isso, uma grande variedade de fatores ambientais provocam danos neste local da cadeia fotossintética (Rea *et al.*, 2011). Foi observado que nas duas condições estudadas, crescimento em meio completo e em meio sem enxofre, a degradação da proteína D1 foi muito intensa (figura 18 e 19) mostrando grande sensibilidade durante os ensaios. No entanto, o resultado que se esperava obter era uma degradação intensa desta proteína em células em meio sem enxofre mas não em meio completo. Isto porque a proteína D1 está em constante renovação e para tal precisa de enxofre disponível para a síntese dos aminoácidos metionina e cisteína (Antal *et al.*, 2010; Ghysels e Franck, 2010).

Constatou-se que o meio sem enxofre foi mais adequado à produção de  $H_2$ . Contudo, não se esperava que nas experiências com enxofre houvesse expressão das hidrogenases (Figura 21) e que fosse produzido hidrogénio (Tabela 4). No entanto, estes resultados já tinham sido obtidos com outro mutante da rubisco, o CC-2803. Neste mutante é também interessante verificar que a maior expressão da enzima hidrogenase se deu às 47 horas,

tanto no meio completo como sem enxofre (Hemschemeier *et al.*, 2008), tal como no mutante Y67A do nosso estudo. O facto de também existir produção de hidrogénio em condições sem enxofre poderá ser explicado pela baixa produção de oxigénio e pelo seu rápido consumo na respiração, especialmente dos mutantes Y67A e Y72A. Ou seja, parece-nos que a necessidade de um balanço ótimo entre libertação de  $O_2$ , consumo de  $O_2$  e produção de hidrogénio é atingindo com os mutantes Y67A e Y72A. No entanto, esta hipótese não parece ser válida para o Y68A e controlo, onde a produção de oxigénio na fotossíntese foi muito mais elevado do que para o Y67A e Y72A (Figura 8). Pensamos que a produção de hidrogénio por estas estirpes se deve ao facto de se ter induzida hipoxia nas culturas (crescimento dos inóculos às escuras e ausência de arejamento durante os ensaios).

Sendo o objetivo principal deste trabalho identificar um mutante que tenha a sua produção de hidrogénio aumentada em relação a outros, é fundamental comparar as taxas de produção obtidas neste estudo (Tabela 4) com outros já publicados. No entanto os valores de hidrogénio obtidos em diferentes estudos não são de fácil comparação dado existirem muitas variáveis, tais como a geometria do recipiente onde se faz o crescimento das culturas, a fonte de carbono do meio, as condições de iluminação, que podem alterar substancialmente os valores apresentados (Eroglu e Melis, 2011). A estirpe controlo utilizada em White e Melis (2006), até às 72 horas produziu 7,19mL  $H_2$ /g Chl. No trabalho de Tolstygina *et al.* (2009), até às 24 horas de cultura a intensidade luminosa foi de  $420\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  a depois foi reduzida para  $25\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Nestas condições às 72 horas, a estirpe controlo produziu 38mL  $H_2$ /L. O mutante, da proteína D1, L159I-N230Y produziu 500mL  $H_2$ /L, até às 72 horas, com uma intensidade luminosa de  $140\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Torzillo *et al.*, 2009; Scoma *et al.*, 2011; Eroglu e Melis, 2011). Da comparação com os resultados apresentados neste trabalho, o mutante da proteína D1 foi o único que apresentou valores de produção de hidrogénio superiores ao mutante Y67A.

Tal como foi sugerido, a solução para um aumento da produção de biohidrogénio depende da alteração das relações entre várias vias metabólicas. Este trabalho demonstra que a rubisco tem um papel preponderante nos processos relacionados com a produção de hidrogénio, a modificação da sua expressão, das suas propriedades catalíticas ou do seu catabolismo pode afetar várias vias metabólicas simultaneamente tal como sugerido por Marin-Navarro *et al.* (2010). Neste trabalho podemos constatar que dos mutantes estudados, o Y67A, que apresentou níveis baixos de expressão da rubisco, uma estrutura frágil da enzima, e maiores diferenças nos parâmetros estudados é um alvo biotecnológico apropriado para aumentar a produção de hidrogénio.

## 5 Conclusão

No âmbito deste trabalho, pode concluir-se que os mutantes analisados são melhores produtores de hidrogénio do que o controlo nas condições sem enxofre. No entanto, nas culturas em meio completo, apenas o mutante Y67A produziu maior quantidade de hidrogénio que o controlo.

Foi possível, com estas estirpes de *C. reinhardtii* e as condições utilizadas de ensaio, produzir hidrogénio sem recorrer à deficiência de enxofre no meio de cultura. No entanto, a produção de hidrogénio em todos os mutantes em meio completo foi mais reduzida do que em meio sem enxofre. Será necessário aprofundar o conhecimento metabólico das *C. reinhardtii* para que seja possível atingir valores de produção de hidrogénio em meio completo mais elevados para que seja possível a sua utilização a nível industrial.

No presente trabalho o grande aumento da produção de hidrogénio pelo mutante Y67A parece dever-se a dois fatores: (1) apresentar uma taxa fotossintética muito baixa, dado que quantidade de oxigénio produzida na fotossíntese foi quase nula não havendo inibição da hidrogenase pelo oxigénio produzido durante a fotossíntese. (2) apresentar níveis baixos de rubisco e uma estrutura bastante frágil que se denota pela maior degradação desta proteína durante os ensaios o que vai implicar um processo de regulação negativo ao nível do ciclo de Calvin que é o maior competidor para o poder redutor usado pelas hidrogenases.

A comparação dos nossos resultados com os já existentes na literatura veio esclarecer mais um passo na otimização ambiental para a produção de hidrogénio com *C. reinhardtii*.

## 6 Perspetivas futuras

No seguimento do trabalho aqui apresentado, será interessante identificar e caracterizar a expressão genica dos mutantes da rubisco nas duas condições estudadas (meio sem enxofre e meio completo).

Parece promissora a utilização do mutante Y67A para a produção de hidrogénio. Para uma aplicação industrial será necessário fazer um estudo do crescimento de culturas, em meio com e sem enxofre, em larga escala, e otimizar a produção de hidrogénio nessas condições.

1 – Parte dos resultados apresentados nesta tese de mestrado foram utilizados num póster para o XVII Congresso Nacional de Bioquímica que se realizou no Porto nos dias 15, 16 e 17 de dezembro de 2010. O resumo apresentado no congresso foi o seguinte:

Changes in rubisco from *Chlamydomonas* induce metabolic alterations: a potential  
advantage for hydrogen photoproduction

T. Pinto, J. Arrabaça, F. X. Malcata, M. G. Esquível

Hydrogen can be produced using solar energy by microalgae that have the notable ability to reduce free protons to hydrogen as catalyzed by hydrogenases. Due to the remarkable metabolic complexity and flexibility for acclimation to external environments, *Chlamydomonas reinhardtii* has been considered one of the best eukaryotic producer of hydrogen. The basic metabolic constraint raised upon H<sub>2</sub> bioproduction in the light phase is inactivation of said hydrogenases by molecular oxygen – a by-product of photosynthesis carried out in Photosystem II (PSII).

“Anaerobic oxygenic photosynthesis” thus appears as a particularly interesting metabolic condition for hydrogen production: the oxygen released by photosynthesis is taken up by cell respiration, thus causing anaerobiosis in the light phase. It well known that PSII activity can be reduced by regulatory feed-back reaction, when Calvin-Benson cycle is slowed down. Rubisco controls the first step of this cycle, so it should be an appropriate target for biotechnological manipulation affecting the evolution/consumption of oxygen in the metabolizing cell.

In order to improve hydrogen release, the metabolic behaviour of three rubisco site-directed mutants – Y67A, Y68A and Y72A, were monitored; two of them exhibit a slow autotrophic growth. The classical S-deprived condition, utilized to trigger and maintain hydrogen release, was used to check the levels of chlorophylls and proteins implicated in the process (i.e. hydrogenase, rubisco and D1) in *C. reinhardtii* mutants for up to 96h. The responses of the



cells to S-deprived stress were apparently delayed for 24 h in Y67A and Y72A cells, as compared with the control and the Y68A mutant.

Measurements of respiration and light-induced oxygen evolution with a Clark-type O<sub>2</sub> electrode demonstrated that the mutants Y67A and Y72A shared a very low O<sub>2</sub> evolution capacity, thus producing a steady state involving O<sub>2</sub> release by photosynthesis and the O<sub>2</sub> uptake by respiration – a key factor for success in sustained H<sub>2</sub> production.

2 - O trabalho de revisão bibliográfica desta tese foi em parte utilizado para a elaboração do artigo: Esquivel, M. G.; Amaro, H. M.; Pinto, T. S.; fevereiro, P. S.; Malcata, F. X. (2011) Efficient H<sub>2</sub> production via *Chlamydomonas reinhardtii*. *Trends Biotechnol* **29**, 595-600. O resumo do artigo é o seguinte:

“Molecular hydrogen (H<sub>2</sub>) obtained from biological sources provides an alternative to bulk chemical processes that is moving towards large-scale, economical generation of clean fuel for automotive engines. This opinion article examines recent improvements in H<sub>2</sub> production by wild and mutant strains of *Chlamydomonas reinhardtii* – the green microalga currently considered the best eukaryotic H<sub>2</sub> producer. Here, we review various aspects of genetic and metabolic engineering of *C. reinhardtii*, as well as of process engineering. Additionally, we lay out possible scenarios that would lead to more efficient research approaches in the near future, as part of a consistent strategy for sustainable biohydrogen supply.”

## 7 Referências bibliográficas

Antal, T. K.; Krendeleva, T. E.; Rubin, A. B. (2010) Acclimation of green algae to sulfur deficiency: underlying mechanisms and application for hydrogen production. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**, 3-15.

Azcón-Bieto, J.; Fleck, I.; Aranda, X. e Xambó, A. (2000) Fotosíntesis en un ambiente cambiante. In: *Fundamentos de fisiología vegetal* (ed. J. Azcón-Bieto e M. Talón). McGraw-Hill/Interamericana de España, Madrid.

Baker, N. R. e Rosenqvist, E. (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J Exp Bot* **55**, 1607–1621.

Baker, N. R. (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 89–113.

Beckmann, J.; Lehr, F.; Finazzi, G.; Hankamer, B.; Posten, C.; Wobbe, L.; Kruse, O. (2009) Improvement of light to biomass conversion by de-regulation of light-harvesting protein translation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol* **142**, 70-77.

Bensadoun, A. e Weinstein, D. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem* **70**, 241-250.

Bollag, D.M. e Edelstein, S.J. (1991) *Protein Methods*. Wiley-Liss, Nova-Iorque, USA, 230pp.

Chen, H-C.; Newton, A. J.; Melis, A. (2005) Role of *SulP*, a nuclear-encoded chloroplast sulfate permease, in sulfate transport and H<sub>2</sub> evolution in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis Res* **84**, 289-296.

Chochois, V.; Constans, L.; Dauvillée, D.; Beyly, A.; Solivérès, M.; Ball, S.; Peltier, G.; Cournac, L. (2010) Relationships between PSII-independent hydrogen bioproduction and starch metabolism as evidenced from isolation of starch catabolism mutants in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int J Hydrogen Energ* **35**, 10731-10740.

Degrenne, B.; Pruvost, J.; Legrand, J. (2011) Effect of prolonged hypoxia in autotrophic conditions in the hydrogen production by the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* in photobioreactor. *Bioresour Technol* **102**, 1035-1043.

Doebbe, A.; Rupprecht, J.; Beckmann, J.; Mussnug, J. H.; Hallmann, A.; Hankamer, B.; Kruse, O. (2007) Functional integration of the *HUP1* hexose symporter gene into the genome of *C. reinhardtii*: impacts on biological H<sub>2</sub> production. *J Biotechnol* **131**, 27-33.

Doebbe, A.; Keck, M.; La Russa, M.; Mussnug, J. H.; Hankamer, B.; Tekçe, E.; Niehaus, K.; Kruse, O. (2010) The interplay of proton, electron, and metabolite supply for photosynthetic H<sub>2</sub> production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **285**, 30247-30260.

Dubini, A.; Mus, F.; Seibert, M.; Grossman, A. R.; Posewitz, M. C. (2009) Flexibility in anaerobic metabolism as revealed in a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* lacking hydrogenase activity. *J Biol Chem* **284**, 7201-7213.

Eroglu, E. e Melis, A. (2011) Photobiological hydrogen production: recent advances and state of the art. *Bioresour Technol* **102**, 8403-8413.

Esquível, M.G.; Ferreira, R.B.; Teixeira, A.R. (1998) Protein degradation in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants with particular reference to ribulose biphosphate carboxylase and glycolate oxidase. *J Exp Bot* **49**, 807-816.

Esquível, M. G.; Pinto, T. S.; Marín-Navarro, J.; Moreno, J. (2006) Substitution of tyrosine residues at the aromatic cluster around the  $\beta$ A- $\beta$ B loop of rubisco small subunit affects the structural stability of the enzyme and the *in vivo* degradation under stress conditions. *Biochem* **45**, 5745-5753.

Esquivel, M. G.; Amaro, H. M.; Pinto, T. S.; fevereiro, P. S.; Malcata, F. X. (2011) Efficient H<sub>2</sub> production via *Chlamydomonas reinhardtii*. *Trends Biotechnol* **29**, 595-600..

Ferreira, R. B.; Esquivel, M. G.; Teixeira, A. R. (1992) Catabolism of ribulose biphosphate carboxylase from higher plants. *Curr Topics Phytochem* **3**, 129-165.

Flynn, T.; Ghirardi, M. L.; Seibert, M. (2002) Accumulation of O<sub>2</sub>-tolerant phenotypes in H<sub>2</sub>-producing strains of *Chlamydomonas reinhardtii* by sequential applications of chemical mutagenesis and selection. *Int J Hydrogen Energy* **27**, 1421-1430.

Forestier, M.; King, P.; Zhang, L.; Posewitz, M.; Schwarzer, S.; Happe, T.; Ghirardi, M. L.; Seibert, M. (2003) Expression of two [Fe]-hydrogenases in *Chlamydomonas reinhardtii* under anaerobic conditions. *Eur J Biochem* **270**, 2750-2758.

Gaffron, H. e Rubin, J. (1942) Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *J Gen Physiol* **26**, 219-240.

Gest, H. e Kamen, M. D. (1949) Photoproduction of molecular hydrogen by *Rhodospirillum rubrum*. *Science* **109**, 558-559.

Ghirardi, M.L.; Togasaki, R. K.; Seibert, M. (1997) Oxygen sensitivity of algal H<sub>2</sub>-production. *Appl Biochem Biotechnol* **63**, 141–151.

Ghysels, B. e Franck, F. (2010) Hydrogen photo-evolution upon S deprivation stepwise: an illustration of microalgal photosynthetic and metabolic flexibility and a step stone for future biotechnological methods of renewable H<sub>2</sub> production. *Photosynth Res* **106**, 145-154.

Godman, J. E.; Molnár, A.; Baulcombe, D. C.; Balk, J. (2010) RNA silencing of hydrogenase(-like) genes and investigation of their physiological roles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem J* **431**, 345-351.

Guy, G.R. (1996) Detection of Proteins on Blots Using Chemiluminescent Systems. In *The Protein Protocols Handbook* (ed. J. M. Walker). Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Hames B.D. (1990) One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In *Gel electrophoresis of proteins: A practical approach*, 2nd edition (ed. B.D. Hames and D. Rickwood). Oxford University Press, New York.

Happe, T. e Kaminski, A. (2002) Differential regulation of the Fe-hydrogenase during anaerobic adaptation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem* **269**, 1022-1032.

Happe, T. e Naber J. D. (1993) Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem* **214**, 475-81.

Harris, E. (ed) (2009) The *Chlamydomonas* Sourcebook, Vol. 1. Academic Press.

Hemschemeier, A.; Fouchard, S.; Cournac, L.; Peltier, G.; Happe, T. (2008) Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*: an elaborate interplay of electron sources and sinks. *Planta* **227**, 397-407.

Hemschemeier, A.; Melis, A.; Happe, T. (2009) Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae. *Photosynth Res* **102**, 523-540.

IEA - International Energy Agency (2010) Key world energy statistics. Head of communication and information office. France.

Jones, M.G.K.; Outlaw Jr., W.H.; Lowry, O.H. (1977) Enzymic Assay of  $10^{-7}$  to  $10^{-14}$  Moles of Sucrose in Plant Tissues. *Plant Physiol* **60**, 379-383.

Kapralov, M. V.; Kubien, D. S.; Andersson, I.; Filatov, D. A. (2011) Changes in rubisco kinetics during the evolution of C4 photosynthesis in Flaveria (Asteraceae) are associated with positive selection on genes encoding the enzyme. *Mol Biol Evol* **28**, 1491–1503.

Khrebtukova, I.; Spreitzer, R.J. (1996) Elimination of the Chlamydomonas gene family that encodes the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 13689-13693.

Kola, H. e Wilkinson, K. J. (2005) Cadmium uptake by a green alga can be predicted by equilibrium modelling. *Environ Sci Technol* **39**, 3040-3047.

Kruse, O.; Rupprecht, J.; Bader, K. P.; Thomas-Hall, S.; Schenk, P. M.; Finazzi, G.; Hankamer, B. (2005) Improved photobiological H<sub>2</sub> production in engineered green algal cells. *J Biol Chem* **280**, 34170-34177.

Kruse, O. e Hankamer, B. (2010) Microalgal hydrogen production. *Curr Opin Biotechnol* **21**, 1-6.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lee J.W. e Greenbaum E. (2003) A new oxygen sensitivity and its potential application in photosynthetic H<sub>2</sub> production. *Appl Biochem Biotechnol* **105 -108**, 303-313.

Long, H.; King, P. W.; Ghirardi, M. L.; Kim, K. (2009) Hydrogenase/ferredoxin charge-transfer complexes: effect of hydrogenase mutations on the complex association. *J Phys Chem A* **113**, 4060-4067.

Mackinney, G. (1941) Absorption of light by chlorophyll solutions. *J Biol Chem* **140**, 315-322.

Maione, T. E. e Gibbs, M. (1986) Hydrogenase-Mediated activities in isolated chloroplasts of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **80**, 360-363.

Makarova, V. V.; Kosourov, S.; Krendeleva, T. E.; Semin, B. K.; Kukarskikh, G. P.; Rubin, A. B.; Sayre, R. T.; Ghirardi, M. L.; Seibert, M. (2007) Photoproduction of hydrogen by sulfur-deprived *C. reinhardtii* mutants with impaired photosystem II photochemical activity. *Photosynthesis Res* **94**, 79-89.

Marín-Navarro, J.; Esquivel, M.G.; Moreno, J. (2010) Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii* revisited: Rubisco as a biotechnological target. *World J Microbiol Biotechnol* **26**, 1785-1793.

Maul, J. E.; Lilly, J. W.; Cui, L.; dePamphilis, C. W.; Miller, W.; Harris, E. H.; Stern, D. B. (2002) The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. *Plant Cell* **14**, 2659–2679.

Melis, A.; Zhang, L.; Forestier, M.; Ghirardi, M. L.; Seibert, M. (2000) Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **122**, 127–135.

Melis, A. (2002) Green alga hydrogen production: progress, challenges and prospects. *Int J Hydrogen Energy* **27**, 1217-1228.

Melis, A. (2007) Photosynthetic H<sub>2</sub> metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* (unicellular green algae). *Planta* **226**, 1075-1086.

Merchant, S. S.; Prochnik, S. E.; Vallon, O.; Harris, E. H.; Karpowicz, S. J.; Witman, G. B.; Terry, A.; Salamov, A.; Fritz-Laylin, L. K.; Maréchal-Drouard, L.; Marshall, W. F.; Qu, L.-H.; Nelson, D. R.; Sanderfoot, A. A.; Spalding, M. H.; Kapitonov, V. V.; Ren, Q.; Ferris, P.; Lindquist, E.; Shapiro, H.; Lucas, S. M.; Grimwood, J.; Schmutz, J.; Chlamydomonas Annotation Team; JGI Annotation Team; Grigoriev, I. V.; Rokhsar, D. S.; Grossman, A. R.

(2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* **318**, 245-251.

Mus, F.; Cournac, L.; Cardettini, V.; Caruana, A.; Peltier, G. (2005) Inhibitor studies on non-photochemical plastoquinone reduction and H<sub>2</sub> photoproduction in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* **1708**, 322 – 332.

Mus, F.; Dubini, A.; Seibert, M.; Posewitz, M. C.; Grossman, A. R. (2007) Anaerobic acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii* – anoxic gene expression, hydrogenase induction, and metabolic pathways. *J Biol Chem* **282**, 25475–25486.

Pampulha, M. E. (1998) Nutrição e crescimento de micro-organismos. In *Microbiologia – volume I* (ed. Wanda F. C. Ferreira, João C. F. Sousa). Lidel, Portugal.

Polle, J. E. W.; Kanakagiri, S.; Jin, E.; Masuda, T.; Melis, A. (2002) Truncated chlorophyll antenna size of the photosystems – a practical method to improve microalgal productivity and hydrogen in mass culture. *Int J Hydrogen Energy* **27**, 1257-1264.

Posewitz, M. C.; Dubini, A.; Meuser, J. E.; Seibert, M.; Ghirardi, M. L. (2009) Hydrogenases, hydrogen production, and anoxia. In *The Chlamydomonas sourcebook: organellar and metabolic processes - volume 2* (ed. David B. Stern). Academic Press, Canada.

Rea, G.; Lambrev, M.; Polticelli, F.; Bertalan, I.; Antonacci, A.; Pastorelli, S.; Damasso, M.; Johanningmeier, U.; Giardi, M. T. (2011) Directed Evolution and In Silico Analysis of Reaction Centre Proteins Reveal Molecular Signatures of Photosynthesis Adaptation to Radiation Pressure. *PLoS One*. **6**, 1-11. doi: 10.1371/journal.pone.0016216.

Redding, K. E. e Cole, D. G. (2008) *Chlamydomonas*: a sexually active, light-harvesting, carbon-reducing, hydrogen-belching ‘planimal’. *EMBO reports* **9**, 1182–1187.

Ricardo, C.P. e Teixeira, A.N. (1993) Moléculas biológicas – estrutura e propriedades. 4<sup>a</sup> edição. Didática editora. 277 pp.

Rood, D. (1995) A practical guide to the care, maintenance, and troubleshooting of capillary gás chromatographic systems. 2<sup>nd</sup> edition. Hüthig Verlag Heidelberg.

Rühle, T.; Hemschemeier, A.; Melis, A.; Happe, T. (2008) A novel screening protocol for the isolation of hydrogen producing *Chlamydomonas reinhardtii* strains. *BMC Plant Biol* **8**, 107.

Santos, F. e Santos, F. (2005) O combustível “hidrogénio”. *Millenium – Revista do Instituto Superior Politécnico de Viseu* **31**, 252-270.

Scoma, A.; Krawietz, D.; Faralonia, C.; Giannelli, L.; Happe, T.; Torzillo, G. (2011) Sustained H<sub>2</sub> production in a *Chlamydomonas reinhardtii* D1 protein mutant. *J Biotechnol* doi:10.1016/j.jbiotec.2011.06.019.

Show, K-Y.; Lee, D-J.; Chang, J-S. (2011) Bioreactor and process design for biohydrogen production. biohydrogen production. *Bioresour Technol* doi:10.1016/j.biortech.2011.04.055.

Spreitzer, R. J.; Esquivel, M.G.; Du, Y-C.; McLaughlin, P. D. (2001) Alanine-scanning mutagenesis of the small-subunit  $\beta$ A- $\beta$ B loop of chloroplast ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: substitution at arg-71 affects thermal stability and CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> specificity. *Biochem* **40**, 5615-5621.

Spreitzer, R.J. e Salvucci, M. E. (2002) Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 449-475.

Spreizer, R. J. (2003) Role of the small subunit in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Arch Biochem Biophys* **414**, 141-149.

Standfuss, J. e Kühlbrandt, W. (2004) The three isoforms of the light-harvesting complex II: spectroscopic features, trimer formation, and functional roles. *J Biol Chem* **279**, 36884-36891.

Stephenson, M. e Stickland, L. H. (1931) Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen - The properties of the enzyme. *Biochem J* **25**, 205–214.

Surzycki, R.; Cournac, L.; Peltier, G.; Rochaix, J-D. (2007) Potential for hydrogen production with inducible chloroplast gene expression in *Chlamydomonas*. *Proc Nat Acad Sci USA* **104**, 17548-17553.



- Timmins, M.; Thomas-Hall, S. R.; Darling, A.; Zhang, E.; Hankamer, B.; Marx, U. C.; Schenk, P. M. (2009) Phylogenetic and molecular analysis of hydrogen-producing green algae. *J Exp Bot* **60**, 1691-1702.
- Tolstygina, I. V.; Antal, T. K.; Kosourov, S. N.; Krendeleva, T. E.; Rubin, A. B.; Tsygankov, A. A. (2009) Hydrogen production by photoautotrophic sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* pregrown and incubated under high light. *Biotechnol Bioeng* **102**, 1055-1061.
- Torzillo, G.; Scoma, A.; Faraloni, C.; Ena, A.; Johanningmeier, U. (2009) Increased hydrogen photoproduction by means of a sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* D1 protein mutant. *Int J Hydrogen Energy* **34**, 4529-4536.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci* **76**, 4350-4354.
- Vahrenholz, C.; Riemen, G.; Pratje, E.; Dujon, B.; Michaelis, G. (1993) Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the structure of the ends of the linear 15.8-kb genome suggests mechanisms for DNA replication. *Curr Genet* **24**, 241-247.
- Vignais, P.M.; Billoud, B.; Meyer, J. (2001) Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 455-501.
- Walker, D.A. (1993) Polarographic measurement of oxygen. In *Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual* (ed. D.O. Hall, J.M.O. Scurlock, H.R. Bolhàr-Nordenkamp, R.C. Leegood and S.P. Long). Chapman & Hall, London.
- White, A. L. e Melis, A. (2006) Biochemistry of hydrogen metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* wild type and a rubisco-less mutant. *Int J Hydrogen Energy* **31**, 455-464.
- Wu, S.; Huang, R.; Xu, L.; Yan, G.; Wang, Q. (2010) Improved hydrogen production with expression of hemH and lba genes in chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biotechnol* **146**, 120-125.
- Chlamy Center – An Online Informatics Resource for *Chlamydomonas* (16.06.2011)  
<http://www.chlamy.org>

Adams, Mike - *Chlamydomonas* teaching center (16.06.2011)

<http://nutmeg.easternct.edu/~adams/ChlamyTeach/aboutchlamy.html>